

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

Harlan Hallamys de Lima Nascimento

NEOPLASMAS TESTICULARES EM CÃES

Santa Maria, RS

2020

Harlan Hallamys de Lima Nascimento

NEOPLASMAS TESTICULARES EM CÃES

Tese apresentada ao 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 parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Glauca Denise Kommers

Santa Maria, RS
2020

Harlan Hallamys de Lima Nascimento

NEOPLASMAS TESTICULARES EM CÃES

Tese apresentada ao 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 parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Aprovado em 17 de fevereiro de 2020:

Glauca Denise Kommers, PhD (UFSM)

(Presidente/Orientador)

Maria Andréia Inkelmann, Dra. (UNIJUÍ)

Maria Elisa Trost Dra. (UNIPAMPA)

Mariana Martins Flores, Dra. (UFSM)

Daniel Curvello De Mendonça Müller Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, minha saúde e minha amada família (Helan, Maria Aparecida, Herlan, Darlan e Thalyta). O amor incondicional de vocês é o bem mais precioso que tenho. Agradeço aos meus mentores (Glaucia, Mariana, Luiz Francisco e Ricardo) por todos os ensinamentos, pelas oportunidades e pelo comprometimento para com meu aprendizado. Agradeço em especial a minha orientadora professora Glaucia D. Kommers pela amizade e pelo empenho com meu treinamento em patologia veterinária. Agradeço aos meus amigos, parceiros de batalha, minha geração LPV-UFSM de pós-graduandos (Walter, Alex, Stella, Marcella, Taiara, Pamela e Vanessa). Com vocês eu combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé. Por fim, agradeço aos meus queridos amigos estagiários e ex-estagiários do LPV-UFSM (Luiza, Luiz, Éryca, Nicolas, Amanda, Morgana, Gabriela, Bianca e Valentina) com vocês, eu pude cativar cada vez mais meu amor pela patologia veterinária e pela docência.

RESUMO

NEOPLASMAS TESTICULARES EM CÃES

AUTOR: Harlan Hallamys de Lima Nascimento

ORIENTADORA: Glaucia Denise Kommers

O principal objetivo deste estudo foi revisar os protocolos de biópsias dos neoplasmas testiculares caninos em um período de 19 anos, afim de caracterizar a prevalência e os aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos desses neoplasmas. Parâmetros quanto à idade, porte e raça dos cães acometidos também foram estabelecidos. Adicionalmente, objetivou-se relatar um caso incomum de um leydigoma maligno em um cão. Foram obtidos dados referentes às raças e idades dos cães machos acometidos e os aspectos clínicos e macroscópicos a partir do arquivo de laudos de biópsias do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) em um período de 19 anos (2000 a 2018). Do total de casos de biópsias recebidas de cães machos, foram contabilizados os cães com neoplasmas testiculares, bem como o total de neoplasmas diagnosticados em diferentes órgãos nesses cães. A prevalência de cães com neoplasmas testiculares foi de 213/1.900 casos, perfazendo 11,2%. Em 190/213 casos, os blocos de parafina estavam disponíveis para reavaliação dos neoplasmas. Considerando esses 190 casos/cães, um total de 220 neoplasmas foram diagnosticados. Os tumores testiculares mais frequentes na rotina diagnóstica foram: seminomas (88/220), leydigomas (64/220), sertoliomas (61/220;) e o tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS; 07/220). Raças de grande porte tiveram o maior número de casos (50/119), seguido das raças de pequeno (47/119) e médio porte (22/119). As idades entre todos os cães desse levantamento variaram de 10 meses a 18 anos. Em alguns seminomas intratubulares, foi possível sugerir dois locais de transformações neoplásicas das células germinativas intratubulares. O sertolioma foi o neoplasma de maior heterogeneidade quanto ao formato e arranjo celulares. A maior parte dos cães acometidos por leydigomas tinha os tipos sólido-difuso e cístico-vascular, enquanto uma menor proporção dos tumores era formada por um desses padrões junto com o padrão pseudoadenomatoso. Através deste estudo foi possível avaliar os principais aspectos dos neoplasmas testiculares caninos e categorizar as raças, portes e grupos etários dos cães acometidos no período estudado. A reavaliação histopatológica possibilitou detalhamento aprofundado sobre a morfologia celular desses neoplasmas. O segundo artigo relata um caso incomum de leydigoma maligno em um cão com metástase cutânea e para linfonodos e infiltração da musculatura abdominal. Em cães, leydigomas malignos são raros, com escassos relatos na literatura internacional. O caso relatado neste estudo foi observado em um Beagle de seis anos. O testículo esquerdo estava completamente obliterado por uma massa, firme, branco-acinzentada. Na microscopia, as células neoplásicas tinham citoplasma abundante eosinofílico e limites celulares pouco distintos. Alto grau de pleomorfismo, células atípicas e figuras de mitose abundantes foram observadas. A partir de um painel imuno-histoquímico foi possível descartar outros diagnósticos diferenciais. Dessa forma, esse relato descreveu um tumor de células intersticiais maligno com metástases disseminadas em um cão.

Palavras-chave: Cães. Neoplasma Testiculares. Aspectos clínicos. Morfologia.

ABSTRACT

TESTICULAR NEOPLASMS IN DOGS

AUTHOR: Harlan Hallamys de Lima Nascimento

ADVISOR: Glaucia Denise Kommers

The main objective of this study was to review the biopsy protocols of canine testicular neoplasms over a period of 19 years, in order to characterize the prevalence and the clinical, macroscopic and histopathological aspects of these neoplasms. Parameters regarding the age, size and breed of the affected dogs were also established. Additionally, the objective was to report an uncommon case of a malignant Leydig cell tumor in a dog. Data regarding the breeds and ages of the affected male dogs and the clinical and macroscopic aspects were obtained from the biopsy reports of the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) over a period of 19 years (2000 to 2018). Of the total number of biopsies received from male dogs, dogs with testicular neoplasms were counted, as well as the total number of neoplasms diagnosed in different organs in these dogs. The prevalence of dogs with testicular neoplasms was 213/1,900 cases, making up 11.2%. In 190/213 cases, paraffin blocks were available for reevaluation of neoplasms. Considering these 190 cases/dogs, a total of 220 neoplasms were diagnosed. The most frequent testicular tumors in the diagnostic routine were: seminomas (88/220), Leydig cell tumors (64/220), Sertoli cell tumors (61/220;) and the mixed germ-cell sex cord stromal tumor (MGSCCT; 07/220). Large breeds had the highest number of cases (50/119), followed by small (47/119) and medium breeds (22/119). The ages among all dogs in this survey ranged from 10 months to 18 years. In some intratubular seminomas, it was possible to suggest two sites of neoplastic transformation of intratubular germ cells. Sertoli cell tumor was the most heterogeneous neoplasm in terms of cell shape and arrangement. Most dogs affected by Leydig cell tumors had the solid-diffuse and cystic-vascular types, while a smaller proportion of the tumors were formed by one of these patterns together with the pseudoadenomatous pattern. Through this study it was possible to evaluate the main aspects of canine testicular neoplasms and to categorize the breeds, sizes and age groups of dogs affected in the studied period. The histopathological reassessment made it possible to go into greater detail about the cell morphology of these neoplasms. The second article reports an unusual case of malignant Leydig cell tumor in a dog with cutaneous and lymph node metastasis and abdominal muscle infiltration. In dogs, malignant Leydig cell tumors are rare, with few reports in the international literature. The case reported in this study was observed in a six-year-old Beagle. The left testicle was completely obliterated by a firm, grayish-white mass. Under microscopy, neoplastic cells had abundant eosinophilic cytoplasm and little distinct cell boundaries. High degree of pleomorphism, atypical cells and abundant mitosis figures were observed. Through an immunohistochemical panel, it was possible to rule out other differential diagnoses. Thus, this report described a malignant interstitial cell tumor with disseminated metastases in a dog.

Keywords: Dogs. Testicular neoplasms. Clinical aspects. Morphology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES TESTICULARES EM CÃES.....	8
2.2 PRINCIPAIS TUMORES TESTICULARES EM CÃES.....	8
2.2.1 Tumores do estroma do cordão sexual	8
2.2.1.1 <i>Tumor de células de Sertoli (sertolioma)</i>	8
2.2.1.2 <i>Tumor de células de intersticiais (células de Leydig)</i>	9
2.2.2 Tumores de células germinativas	11
2.2.2.1 <i>Seminomas</i>	11
2.2.2.2 <i>Teratomas</i>	13
2.2.3 Tumores mistos dos testículos	13
2.2.3.1 <i>Tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS)</i>	13
2.2.3.2 <i>Gonadoblastoma</i>	14
2.3 FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES TESTICULARES EM CÃES	15
2.4 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) NO DIAGNÓSTICO DOS TUMORES TESTICULARES CANINOS	16
3 ARTIGO 1 – NEOPLASMAS TESTICULARES EM 190 CÃES: ASPECTOS CLÍNICOS, MACROSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS	19
4 ARTIGO 2 – TESTICULAR INTERSTITIAL CELL TUMOR WITH DISSEMINATED CUTANEOUS METASTASIS IN A DOG	40
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Os neoplasmas testiculares são os tumores mais comuns do trato genital de cães machos (NORTH; BANKS, 2009). A maioria são benignos, no entanto, formas malignas com infiltração em vasos sanguíneos, linfáticos e estruturas testiculares adjacentes, bem como metástases em diferentes órgãos tem sido descritas (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016; MACLACHLAN; KENNEDY, 2002; TAKIGUCHI et al, 2001; TOGNI et al, 2015). Diversas pesquisas abordando os principais aspectos dos neoplasmas testiculares em cães foram realizadas em várias partes do mundo, a partir de necropsias ou espécimes de biópsias (ARGENTA et al, 2016; COTCHIN, 1960; DOW, 1962; GRIECO et al, 2008; LIAO et al, 2009; NODTVEDT et al, 2010; SANTOS et al, 2000; SVARA et al, 2014).

Nesses estudos, a prevalência dos tumores testiculares entre todos os neoplasmas que acometeram cães machos variou de 5,8 a 27%, com diferentes frequências entre os tipos histológicos mais comuns (seminomas, sertoliomas e leydigomas). Algumas raças são tidas como de alto risco e os cães idosos são mais comumente afetados, demonstrando que a ocorrência desses tumores pode estar diretamente associada ao envelhecimento (LIAO et al, 2009; NODTVEDT et al, 2010). No Brasil, há apenas duas pesquisas com essa temática, ambas realizadas nos últimos 20 anos (ARGENTA et al, 2016; SANTOS et al, 2000).

Alguns dos aspectos macroscópicos podem ser bastante sugestivos de tipos específicos (AGNEW; MACLACHLAN, 2017) e no geral, a microscopia é suficiente para o diagnóstico. No entanto, a morfologia celular pode ser bastante variável e alguns tumores são de difícil diagnóstico (COTCHIN, 1960; DOW, 1962). Síndromes clínicas são descritas nos três tipos histológicos mais frequentes (COTCHIN, 1960; KIM; KIM, 2005; MISCHKE et al, 2002; POST; KILBORN, 1987), contudo na maior parte dos casos, são observadas nos sertoliomas, provavelmente por sua habilidade em produzir estrógenos.

Dessa forma, o objetivo desta tese foi revisar os protocolos de biópsias dos neoplasmas testiculares caninos em um período de 19 anos, afim de avaliar seus aspectos clínicos, macroscópicos, histopatológicos, bem como relatar um caso incomum de um leydigoma maligno com metástases cutâneas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES TESTICULARES EM CÃES

Os neoplasmas testiculares primários dos animais domésticos são classificados em três tipos: tumores do cordão estromal, que incluem os sertoliomas e leydigomas, tumores de células germinativas que incluem os seminomas, teratomas, carcinomas embrionários e o carcinoma do saco vitelino, e os tumores testiculares mistos, com o tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS) e o gonadoblastoma (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; KENNEDY et al, 1998).

2.2 PRINCIPAIS TUMORES TESTICULARES EM CÃES

2.2.1 Tumores do estroma do cordão sexual

2.2.1.1 Tumor de células de Sertoli (*sertolioma*)

O tumor de células de Sertoli (*sertolioma*) é um neoplasma comum em cães, originado das células de sustentação dos túbulos seminíferos (ROSVOLL; WOODARD, 1968). Sua média de idade para ocorrência é de 10 anos, no entanto cães criptorquidas entre 7 e 8 anos podem ser afetados (POST; KILBORN, 1987). Estudos apontam que as raças de alto risco para ocorrência desse neoplasma incluem: Pastor de Shetland, Schnauzer, Boxer, Collie e Weimaraner (HAYES; PENDERGRASS, 1976; NODTVEDT et al, 2010; VEGTER et al, 2010). O criptorquidismo é um fator predisponente para o desenvolvimento desse tumor em cães (HAYES; PENDERGRASS, 1976). Segundo Hayes et al (1985), a ocorrência desse neoplasma é cerca de 23 vezes mais frequente em cães criptorquidas do que nos cães com testículos escrotais.

Macroscopicamente são observados nódulos únicos ou múltiplos, bem delimitados e marcadamente firmes. A superfície de corte é branca, firme e raramente têm áreas marrom-amarelas de hemorragia (GRIECO et al, 2008; HONG et al, 2011; MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). A maioria desses tumores são benignos, no entanto, variantes malignas podem invadir estruturas adjacentes aos testículos como a túnica albugínea, epidídimo e o cordão espermático (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Microscopicamente, os sertoliomas são classificados em intratubulares ou difusos (AGNEW; MACLACHLAN, 2017;

KENNEDY et al, 1998). Sertoliomas intratubulares tem células alongadas, vacuolizadas, com citoplasma eosinofílico, dispostas em paliçada, perpendiculares à membrana basal (NIELSEN; LEIN, 1974). Seus núcleos são ovoides, hipercromáticos com nucléolos pequenos e mitoses são extremamente incomuns. As células tumorais podem penetrar a membrana basal e invadir o parênquima testicular adjacente (NIELSEN; LEIN, 1974). Na forma difusa, as estruturas tubulares estão ausentes, ao invés disso há nódulos de células tumorais dispostas em mantos delineados por espessas trabéculas de tecido conjuntivo fibroso (DOW, 1962).

Sertoliomas hormonalmente ativos podem estar associados com a síndrome da feminilização e discrasias hematopoiéticas, devido à elevada produção de estrógeno por esses tumores (ABLE; LEE, 1969; GROOTENHUIS et al, 1990). Em 25 a 50% dos casos, os sinais clínicos da síndrome da feminilização caracterizam-se por alopecia simétrica não pruriginosa, hiperpigmentação, ginecomastia, galactorréia, prepúcio pendular e atratividade a outros cães machos (PAEPE et al, 2016; SANPERA et al, 2002; SIEGEL et al, 1967). Segundo Spackman; Roth, (1988 apud QUARTUCCIO, 2011) e Gill (1981), disfunções prostáticas podem ser observadas durante o desenvolvimento dessa síndrome, essas incluem: hiperplasia prostática, metaplasia escamosa e cistos prostáticos. A intoxicação por estrógenos é uma causa comum de mielossupressão em cães (BOSSCHERE; DEPREST, 2010). O hiperestrogenismo pode ocasionar danos às células tronco da medula óssea e ao microambiente hematopoiético, com consequente pancitopenia que, clinicamente, caracteriza-se por leucopenia, anemia não regenerativa e trombocitopenia (BOSSCHERE; DEPREST, 2010; PAEPE et al, 2016; VALENTE et al, 2017). Os mecanismos da mielotoxicidade induzida por estrógenos não estão completamente esclarecidos. Hipóteses para esses mecanismos incluem: efeitos na diferenciação de células tronco, utilização de ferro e uma possível inibição na produção de fatores de estímulo aos eritrócitos (PAEPE et al, 2016).

2.2.1.2 Tumor de células de intersticiais (células de Leydig)

O tumor de células intersticiais de Leydig (leydigoma) é um neoplasma mesenquimal, originado das células intersticiais de Leydig localizadas entre os túbulos seminíferos (AL-AGHA; AXIOTIS, 2007; GREM et al, 1986). Estudos apontam uma taxa de incidência variando entre 16 a 87% para ocorrência desses tumores (GRIECO et al, 2008; LIAO et al, 2009; SAPIERZYNSKI et al, 2007; SVARA et al, 2014). Diferente do observado nos sertoliomas e seminomas, cães criptorquidas são menos comumente acometidos (HAYES;

PENDERGRASS, 1976). Embora as células intersticiais secretem andrógenos e estrógenos, os leydigomas raramente são associados com manifestações clínicas consequentes da excessiva secreção desses hormônios (MISCHKE et al, 2002; PETERS et al, 2003). A grande maioria desses tumores são benignos, no entanto, formas malignas apesar de extremamente raras têm sido descritas e associadas com metástases para pele, musculatura esquelética (CANADAS; ROMÃO; GARTNER, 2016; TOGNI et al, 2015). Há certa incerteza se a maioria das proliferações de células intersticiais refletem nódulos de hiperplasia ou adenomas devido à baixa incidência de malignidade desses tumores em cães (AGNEW; MACLACHLAN, 2017). Relatos recentes corroboram os achados anteriormente descritos sobre a propensão para metástases nos leydigomas malignos (KUDO et al, 2019). Achados em comum descritos nesses relatos incluem: rápido aumento de volume, obliteração do parênquima testicular e múltiplas metástases no tecido cutâneo.

Os leydigomas são mais frequentes em animais idosos e macroscopicamente são observados como nódulos, amarelo-amarronzados, pequenos, podendo ser uni ou bilaterais, únicos ou múltiplos e causam pouca distorção no parênquima testicular (DOW, 1962; MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Na superfície de corte são bem demarcados, esféricos, e podem ter áreas de hemorragia e formações císticas (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; FOSTER, 2016). Microscopicamente, as células neoplásicas se arranjam em mantos, circundadas por estroma fibrovascular escasso (NIELSEN; LEIN, 1974). O formato celular varia entre redondo e poligonal, com citoplasma eosinofílico e finamente vacuolizado. Os núcleos são redondos e excêntricos, figuras de mitose são raras (GRIECO et al, 2008). Segundo Sanford; Miller; Hoover, (1987), as células tumorais podem ter inclusões eosinofílicas, bem demarcadas, PAS-positivas, decorrentes da invaginação intranuclear do citoplasma. Essas aparecem como vacúolos intranucleares conspícuos com cromatina periférica, substituindo em até mais de 80% o volume do núcleo.

Conforme anteriormente descrito, os leydigomas malignos caracterizam-se macroscopicamente por marcada distorção e obliteração do parênquima testicular por massas de superfície irregular, com extensas áreas de necrose, sendo também relatada invasão das túnicas testiculares (KUDO et al, 2019). A morfologia celular é um tanto variável, podendo ser observadas células bem diferenciadas, com aspectos histomorfológicos semelhantes aos tumores benignos a células com alto índice mitótico e marcado pleomorfismo celular e nuclear. Com exceção das metástases, os critérios histomorfológicos de malignidade ainda são pouco definidos. A imuno-histoquímica com Ki67 tem se mostrado uma ferramenta

promissora na avaliação do índice de proliferação celular, com alta expressão desse anticorpo em tumores malignos (KUDO et al, 2019).

2.2.2 Tumores de células germinativas

2.2.2.1 Seminomas

O seminoma é um neoplasma comum em cães, originado do epitélio germinativo dos túbulos seminíferos (LIAO et al, 2009; MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Semelhante ao visto nos sertoliomas, o criptorquidismo é um fator predisponente para ocorrência desse neoplasma (HAYES; PENDERGRASS, 1976). Cães de média idade e idosos, com faixa etária de 10 anos são mais comumente acometidos (HOGENESCH et al, 1987; SAPIERZYNSKI et al, 2007). Raças predispostas ao desenvolvimento desse tumor incluem: Old English Shepdog, Husky Siberiano, Fox Terrier, Elkhound Norueguês, Samoieda, Pastor Alemão, Boxer, Bulldog e Weimaraner (FAN; LORIMIER, 2007; GRIECO et al, 2008; HAYES; PENDERGRASS, 1976; NODTVEDT et al, 2010).

Macroscopicamente os seminomas são observados como nódulos brancos, pouco demarcados, uni ou bilaterais, únicos ou múltiplos que podem comprimir o parênquima testicular adjacente (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; KENNEDY et al, 1998). Esse tumor geralmente é macio, e tem a superfície de corte homogeneamente branca, por vezes com áreas de hemorragia e necrose (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; GRIECO et al, 2008). Microscopicamente podem ser classificados em intratubulares ou difusos (KENNEDY et al, 1998). Seminomas intratubulares caracterizam-se por agregados intratubulares de células grandes, uniformes, poliédricas, levemente basofílicas, com núcleos grandes, vesiculares e nucléolos proeminentes. Invasão das células neoplásicas dos túbulos para o interstício é um achado frequente (MAIOLINO et al, 2004; NIELSEN; LEIN, 1974). Os seminomas difusos consistem de mantos sólidos de células tumorais uniformes, que envolvem os túbulos seminíferos e são delineados por um estroma escasso. As células neoplásicas são bem delimitadas, grandes, variando de ovais a poliédricas, com núcleos vesiculares e um ou dois nucléolos proeminentes (DOW, 1962; NIELSEN; LEIN, 1974). Mitoses bizarras e agregados perivasculares de linfócitos maduros frequentemente são observados. Por vezes há células gigantes multinucleadas, bem como histiócitos vacuolizados dispersos, dando ao tumor o aspecto de “céu estrelado” (NIELSEN; LEIN, 1974).

A incidência de seminomas malignos é baixa, embora esses claramente ocorram (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; DEMİRKAN et al, 2008). A invasão das células tumorais para as estruturas testiculares adjacentes (túnica albugínea, epidídimos e cordão espermático) é uma forte evidência de malignidade (DEMİRKAN et al, 2008; HOGENESCH et al, 1987; MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Metástases ocorrem em uma baixa porcentagem dos casos e são mais frequentes em cães idosos (LUCAS et al, 2012; KENNEDY et al, 1998), podendo acometer múltiplos órgãos (pele, olhos, encéfalo, peritônio, fígado, rins, linfonodos e pulmão) (HOGENESCH et al, 1987; MCDONALD et al, 1988; SPUGNINI; BARTOLAZZI; RUSLANDER, 2000; TAKIGUCHI et al, 2001). As principais vias para ocorrência de metástases incluem: infiltração, implantação e disseminação por via hematogena ou linfática (TENNANT; KELLY, 1992).

Alguns autores têm demonstrado que os seminomas caninos compartilham semelhanças histomorfológicas com os seminomas humanos que permitem classificá-los nas entidades clássico e espermatocítico (GRIECO et al, 2007; HOHŠTETER et al, 2014; KIM et al, 2010). Nesses estudos foi observada a expressão de PLAP, (c-kit) e PAS em cães com prováveis lesões intratubulares precursoras dos tumores de células germinativas, bem como em seminomas intratubulares e difusos. Contudo, Bush et al (2011) observou em um expressivo número de casos que os critérios histomorfológicos dos seminomas caninos tem maior semelhança com os seminomas espermatocíticos. Nesse estudo, a negatividade para PLAP, bem como a moderada expressão de (c-kit) e a falta de evidências de células do carcinoma *in situ* contrariam a ideia de que os seminomas caninos possam ser originados dos gonócitos. Achados semelhantes foram descritos por Thorvaldsen et al (2012), que observou marcação com PAS e imunomarcação para PLAP em apenas 2 de 45 seminomas em cães. Esses achados, associados à não especificidade de (c-kit) para diagnóstico das neoplasias de células germinativas *in situ* (GCNIS) e dos seminomas clássicos apontam que a grande maioria dos seminomas caninos se assemelham aos seminomas espermatocíticos.

Os estudos anteriormente descritos em cães são precedidos por estudos em humanos, nos quais, os seminomas podem ser classificados em clássicos e espermatocíticos com base nas células de origem (BAHRAMI et al, 2007; MOSTOFI; SESTERHENN, 2004). O seminoma clássico ocorre em jovens adultos, tem curso clínico agressivo e acredita-se que sejam originados dos gonócitos (células germinativas indiferenciadas). O seminoma espermatocítico ocorre em idosos, tem curso clínico benigno e possivelmente é originado de

células germinativas mais diferenciadas (espermatogônias e espermatócitos) (BAHRAMI et al, 2007; SKAKKEBAEK et al, 1987; RO et al, 2013). O Ácido Periódico de Schiff (PAS), bem como a fosfatase alcalina placentária (PLAP) e o CD 117 (c-kit), tem sido empregados na diferenciação desses neoplasmas (BAHRAMI et al, 2007; KRAGGERUD et al, 1999; MOSTOFI; SESTERHENN, 2004). A demonstração de moléculas de glicogênio através do PAS também tem auxiliado a identificação das células de origem das neoplasias de células germinativas *in situ* (GCNIS), nova denominação para as neoplasias de células germinativas intratubulares não classificadas (ITGCNU), também outrora denominado carcinoma *in situ* (MOCH et al, 2016; REINBERG et al, 1989). Essa lesão é amplamente aceita como a alteração indutora no desenvolvimento dos tumores de células germinativas em humanos (RO et al, 2013).

2.2.2.2 *Teratomas*

O teratoma é um neoplasma originado das células germinativas com diferenciação somática, que pode formar vários órgãos ou tecidos a partir de dois ou mais folhetos embrionários (KENNEDY et al, 1998; NAGASHIMA et al, 2000; WAKUI et al, 1992). Esse neoplasma é raro em todas as espécies domésticas, e ocorre mais frequentemente em equinos (KENNEDY et al, 1998). Macroscopicamente podem ser uni ou bilaterais, únicos ou múltiplos, causando marcado aumento de volume do testículo afetado, com áreas sólidas ou císticas, por vezes com focos de cartilagem, osso, gordura, ou pele hirsuta (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Microscopicamente podem variar desde tumores com aspecto cístico a combinações de neoplasmas extremamente complexos, originados de dois ou três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; GULÇUBUK et al, 2012; KENNEDY et al, 1998; NAGASHIMA et al, 2000). A maioria dos teratomas são benignos, no entanto, formas malignas, apesar de raras, têm sido descritas em cães e cavalos (GREENLEE; PATNAIK, 1985; HEADLEY et al, 2006; PATNAIK; MOSTOFI, 1993; SHAW; ROTH, 1986).

2.2.3 Tumores mistos dos testículos

2.2.3.1 *Tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS)*

O TMCGCS é um neoplasma formado a partir de uma dupla população de células neoplásicas originadas do epitélio germinativo, intimamente associadas com células de Sertoli (TALERMAN, 1980; KENNEDY et al, 1998). Cães com criptorquidismo abdominal e inguinal, sem predisposição racial, com média de idade de doze anos são tidos como mais comumente afetados (PATNAIK; MOSTOFI, 1993). Seu comportamento é similar aos seminomas e sertoliomas, embora não induzam ao hiperestrogenismo e geralmente são benignos (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Macroscopicamente, esses neoplasmas são descritos como massas multilobuladas, firmes, brancas ou marrons, uni ou bilaterais, por vezes com áreas de necrose e hemorragia (KENNEDY et al, 1998; OWSTON; RAMOS-VARA, 2007).

Microscopicamente, é observada predominância de um ou outro tipo celular e no geral são encapsulados e têm um estroma fibrovascular ou fibrocolagenoso (PATNAIK; MOSTOFI, 1993). Tumores com predominância de células germinativas formam estruturas císticas e tubulares de vários tamanhos, com células germinativas grandes, bem diferenciadas circundadas por células de Sertoli. As células germinativas neoplásicas têm o citoplasma eosinofílico ou vacuolizado, com cromatina esparsa, núcleos grandes e um ou mais nucléolos (PATNAIK; MOSTOFI, 1993). Os tumores com predominância de células de Sertoli variam em grau de anaplasia e são caracterizados por estruturas tubulares, de vários tamanhos, com células neoplásicas em arranjo sólido ou formando camadas únicas ou múltiplas de células de Sertoli interpostas com células germinativas. O formato celular varia entre cuboide e colunar, com citoplasma basofílico, núcleos hipercromáticos e nucléolos proeminentes (PATNAIK; MOSTOFI, 1993).

2.2.3.2 Gonadoblastoma

Semelhante ao descrito para o tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual, o gonadoblastoma é um neoplasma misto, raramente descrito em cães, formado por células germinativas intimamente associadas com células de Sertoli imaturas (ISHIDA; TAGATZ; OKAGAKI, 1976; REIS-FILHO et al, 2004). Macroscopicamente, são descritos como múltiplos pontos irregulares, pálidos, de 1 a 2 mm de diâmetro, ou como uma massa multinodular, com áreas brancas e firmes (REIS-FILHO et al, 2004; TURK; TURK; GALLINA, 1981). Na microscopia, são observadas massas intratubulares de células germinativas e pequenas células de Sertoli imaturas (padrão de quebra-cabeça), intimamente associadas, circundadas por um estroma hialinizado. Por vezes as células de Sertoli imaturas

circundam áreas eosinofílicas, de um material PAS-positivo, concentricamente laminado, em arranjo similar aos descritos para os corpúsculos de Call-Exner (REIS-FILHO et al, 2004; TURK; TURK; GALLINA, 1981). As células germinativas neoplásicas têm o citoplasma abundante, com núcleos redondos a ovais, cromatina finamente dispersa e com um a dois nucléolos. As células de Sertoli têm o citoplasma escasso com núcleos ovoides reticulares e nucléolos únicos (TURK; TURK; GALLINA, 1981). Mitoses incluindo formas atípicas foram observadas no componente germinativo, mas não no componente das células de Sertoli (REIS-FILHO et al, 2004).

2.3 FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES TESTICULARES EM CÃES

Os principais fatores que podem estar associados ao desenvolvimento de tumores testiculares em cães incluem: idade, raça, criptorquidismo, hérnias inguinais e a exposição à carcinógenos ambientais (HAYES; PENDERGRASS, 1976; LIAO et al, 2009). Cães idosos são propensos ao desenvolvimento de alterações degenerativas nos túbulos seminíferos, bem como neoplasmas testiculares (JAMES; HEYWOOD, 1979; LOWSETH et al, 1990; SANTOS et al, 2000). A taxa de incidência para ocorrência desses tumores aumenta de acordo com a idade, embora os sertoliomas ocorram mais comumente em animais jovens do que os seminomas e leydigomas (HAYES; PENDERGRASS, 1976).

O criptorquidismo é uma falha no desenvolvimento testicular que se caracteriza pela retenção desses na cavidade abdominal, região inguinal, ou pré-escrotal, podendo ser uni ou bilateral (COX et al, 1978). Cães criptorquidas podem ser até 14,3 vezes mais propensos ao desenvolvimento de neoplasmas testiculares (ORTEGA-PACHECO et al, 2006). Em um estudo experimental, observou-se que a indução cirúrgica do criptorquidismo unilateral, tem graves consequências na espermatogênese, bem como nas funções hormonais testiculares (KAWAKAMI; HORI; TSUTSUI, 1999). Ainda segundo esses autores, os testículos escrotais contralaterais sofrem uma série de alterações secundárias ao criptorquidismo. Essas se caracterizaram por: diminuição no volume testicular, diminuição no número de espermatócitos e espermátides, diminuição na viabilidade e motilidade espermática e disfunções hormonais. Seminomas e sertoliomas são tidos como neoplasmas de alto risco em cães criptorquidas. Quando associados com o criptorquidismo, esses tumores costumam ocorrer mais comumente em cães jovens quando comparados aos neoplasmas testiculares de localização escrotal (MADEWELL, 1981; REIF et al, 1979). Segundo Mostofi (1973),

testículos criptorquídicos podem ser propensos ao desenvolvimento de neoplasmas testiculares pelos seguintes fatores: temperatura abdominal elevada, células germinativas defeituosas, interferências na vascularização, distúrbios endócrinos e disgenesia gonadal.

O epitélio germinativo é propenso a diversas injúrias devido à íntima associação e dependência do funcionamento coordenado com outros componentes celulares no parênquima testicular. Dessa forma, embora as células de Sertoli e de Leydig sejam suscetíveis a lesões, sua capacidade de adaptação frente a injúrias tóxicas é melhor quando comparado ao epitélio germinativo (CREASY, 1997). Carcinógenos ambientais e agentes terapêuticos têm sido associados com o aumento na incidência de seminomas e disfunções testiculares em cães do exército dos Estados Unidos que serviram durante a guerra do Vietnã (HAYES et al, 1990, HAYES; TARONE; CASEY, 1995). Além de neoplasmas, outras alterações testiculares observadas nos cães desse estudo incluíram: hemorragias, epididimites, orquites, granuloma espermático e degeneração testicular. Exposições a herbicidas, dioxina e tetraciclina foram tidas como promotoras dessas afecções. Estudos experimentais em animais de laboratório têm demonstrado o potencial nocivo de diversos compostos químicos ao microambiente testicular (EL-SHAHAT et al, 2009; BOEKELHEIDE, 1988; GHOSH et al, 2002; LAG et al, 1989; YANG, et al, 2006). A depender da dose, esses compostos podem severamente comprometer a manutenção da espermatogênese, bem como induzir a diversos tipos de lesões degenerativas e a formação de neoplasmas (COOK et al, 1999; CREASY, 1997). Segundo Henderson et al (1979), elevadas concentrações hormonais de estrógeno e progesterona podem favorecer o desenvolvimento de tumores testiculares em humanos. A incidência desses neoplasmas bem como de anomalias reprodutivas também podem estar associadas com disfunções hormonais consequentes da ação estrogênica e anti-androgênica de poluentes ambientais (SKAKKEBEK et al, 1998).

2.4 UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ) NO DIAGNÓSTICO DOS TUMORES TESTICULARES CANINOS

A IHQ é uma ferramenta de grande aplicabilidade para identificação de populações celulares neoplásicas de tumores testiculares (PATNAIK; MOSTOFI, 1993). O uso de marcadores celulares apropriados pode confirmar ou excluir um neoplasma específico e, em alguns casos, seu prognóstico também pode ser estabelecido (CIAPUTA et al, 2013). A categorização de anticorpos para diagnóstico imuno-histoquímico de tumores testiculares é de grande importância em humanos e cães (EMERSON; ULBRIGHT, 2005; JONES et al, 2004).

Diversos anticorpos têm sido usados numa tentativa de determinar a origem específica das células neoplásicas de tumores testiculares. Entretanto não há um painel imuno-histoquímico bem estabelecido para cães. Entre esses, a inibina-alfa e a vimentina tem mostrado boa reatividade na imunomarcção de vários tipos de tumores testiculares (PATNAIK; MOSTOFI, 1993; YU et al, 2009). Em um relato em um cão, um tumor maligno de células intersticiais de Leydig demonstrou imunomarcção para vimentina, inibina-alfa e calretinina (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016).

A vimentina é uma proteína da família dos filamentos intermediários, considerada como principal proteína das células mesenquimais, sendo frequentemente utilizada como marcador celular e tecidual (IVASKA et al, 2007). Em cães, o uso desse marcador em tumores de células intersticiais, tem demonstrado um padrão de imunomarcção heterogêneo, variando de fraco a intenso (PETERS et al, 2001).

A inibina-alfa é uma proteína gonadal sintetizada pelas células de Sertoli, envolvida no controle da liberação do hormônio folículo estimulante pela hipófise (TANIYAMA et al, 2001). A imunorreatividade desse marcador tem sido observada no citoplasma das células dos tumores intersticiais caninos (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016; TANIYAMA et al, 2001). A calretinina é uma proteína de ligação ao cálcio presente nas células intersticiais de Leydig e nas células de Sertoli, implicada como possível reguladora da esteroidogênese que tem sido demonstrada nos principais neoplasmas testiculares caninos (RADI; MILLER, 2005). Outro estudo corrobora com esses achados demonstrando que esse marcador é positivamente expresso no núcleo e citoplasma de células de Leydig malignas (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016).

A 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β -HSD) é uma enzima que catalisa a oxidação e isomerização dos percursores hidroxisteroides em cetoesteroides, provendo a formação de hormônios sexuais (RHEAUME et al, 2005). O uso da 3 β -HSD como marcador celular tem demonstrado um padrão de imunomarcção intracitoplasmático forte difuso nos tumores de células intersticiais caninos, no entanto nenhum padrão de imunomarcção foi observado nos sertoliomas e seminomas (PETERS et al, 2001; TANIYAMA et al, 2001). A proteína KIT (CD 117) é um receptor transmembrana para a enzima tirosina quinase, codificado pelo protooncogene *c-KIT*, que tem como ligante um fator de células tronco pertencente à família dos fatores de crescimento ancorados à membrana celular (MASSAGUÉ; PANDIELLA, 1993; SATTLER; SALGIA, 2004). Similar ao observado em humanos, os tumores de células intersticiais e os seminomas caninos tidos como clássicos, de acordo com a classificação

humana, expressam imunomarcção intracitoplasmática difusa para a proteína KIT (GRIECO et al, 2010).

A fosfatase alcalina placentária (PLAP; placental alkaline phosphatase) é uma enzima glicoproteica de superfície celular, usada como marcador celular em vários tipos de tumores (MILLÁN, 1986). Em seminomas caninos, esse marcador tem demonstrado um padrão de imunomarcção citoplasmático e membranosos de intensidade moderada, com incidência de 33% nos seminomas intratubulares e 15% nos seminomas difusos (GRIECO et al, 2007; HOHSTETER et al, 2014). Conforme descrito em humanos, os seminomas caninos podem ser classificados nas entidades clássica e espermatocítica com base na imunomarcção para a PLAP e para a proteína KIT (HOHSTETER et al, 2014).

O hormônio anti-Mülleriano, ou fator inibitório Mülleriano, é uma glicoproteína testicular fetal, produzida pelas células de Sertoli, responsável pela regressão dos ductos Müllerianos nos testículos fetais (JOSSO; PICARD, 1986; REY et al, 1993). Esse hormônio tem sido empregado em humanos como marcador imuno-histoquímico para sertoliomas e gonadoblastomas (REY et al, 2000). Seu uso nos sertoliomas caninos tem mostrado um padrão de marcação citoplasmático, heterogêneo, com alta porcentagem de células imunomarcadas (BANCO et al, 2012).

A proteína de ligação GATA-4 é um fator de transcrição que regula a expressão gênica e a diferenciação e proliferação celular em uma variedade de tecidos, dessa forma é implicada no desenvolvimento gonadal e diferenciação sexual de mamíferos (LAITINEN et al, 2000; VIGER et al, 1998). Em cães, o anticorpo policlonal anti-GATA-4 demonstra um padrão de marcação nuclear forte, com fraca marcação citoplasmática nos sertoliomas e nas células de Sertoli neoplásicas do TMCSCS (RAMOS-VARA; MILLER, 2009).

3 ARTIGO 1 – NEOPLASMAS TESTICULARES EM 190 CÃES: ASPECTOS CLÍNICOS, MACROSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Artigo a ser submetido para Pesquisa Veterinária Brasileira.

3 ARTIGO 1 –

Neoplasmas testiculares em 190 cães: aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos¹

H. H. L. Nascimento², A. Santos², A. L. Prante³, E. C. Lamego³, L. A. S. Tondo³, M. M. Flores⁴, R. A. Fighera⁴ & G. D. Kommers^{4*}

ABSTRACT. – H. H. L. Nascimento, A. Santos, A. L. Prante, E. C. Lamego, L. S. Tondo, M. M. Flores, R. A. Fighera e G. D. Kommers. [**Testicular tumors in 190 dogs: clinical, macroscopic and histopathological aspects.**]

Neoplasmas testiculares em 190 cães: aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: glaukommers@yahoo.com

This study aimed to characterize the prevalence, clinical, macroscopic and histopathological aspects of dogs affected by testicular neoplasms, based on biopsy specimens from the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) over a period of 19 years. Parameters regarding the age, size and breed of the affected dogs were also established. Of all dogs with some type of neoplasm submitted to histopathological analysis in the LPV in these 19 years (n = 1,900), 213 (11.2%) had at least one testicular neoplasm. The tissues of 190 dogs (with 220 neoplasms) were available for histological reassessment. The dogs in this study had different types of testicular neoplasms with relatively similar frequencies. In descending order, the most frequent testicular neoplasms were: seminomas (88/220), Leydig cell tumor (64/220), Sertoli cell tumor (61/220) and the mixed germ-cell sex cord stromal tumor (MGST); (07/220). Among the dogs with defined breed (119 cases), the large breeds had the highest number of cases (50/119), followed by the small (47/119) and medium sized breeds (22/119). The ages of dogs affected by testicular neoplasms ranged from 10 months to 18 years. Increase in testicular volume was the most common clinical manifestation. Eleven dogs had information about clinical signs suggestive of the feminization syndrome. In some intratubular seminomas, it was possible to detect two sites suggestive of neoplastic transformations of intratubular germ cells. Leydig cell tumor and mainly Sertoli cell tumor were neoplasms with high variation in cell morphology, emphasizing the importance of knowing their histomorphological variations, especially in cases with histological arrangements similar to these two tumors. Through this study it was possible to establish some of the main clinical, macroscopic and histopathological aspects of testicular neoplasms diagnosed over a 19-year period in the area covered by the LPV-UFSM.

INDEX TERMS: dogs, testicular neoplasms, clinical aspects, morphology.

RESUMO. – Este estudo teve por objetivo caracterizar a prevalência, aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos dos cães acometidos por neoplasmas testiculares, a partir dos espécimes de biópsias do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) em um período de 19 anos. Parâmetros quanto à idade, porte e raça dos cães acometidos também foram estabelecidos. De todos os cães com algum tipo de neoplasma submetido à análise histopatológica no LPV nesses 19 anos (n=1.900), 213 (11,2%) tinham ao menos um neoplasma testicular. Os tecidos de 190 cães (com 220 neoplasmas) estavam disponíveis para reavaliação histológica. Os cães deste estudo apresentaram diferentes tipos de neoplasmas testiculares com frequências relativamente semelhantes. Em ordem decrescente, os neoplasmas testiculares mais frequentes foram: seminomas (88/220), leydigomas (64/220), sertoliomas (61/220) e o tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS; 07/220). Dentre os cães com raça definida (119 casos), as raças de grande porte tiveram o maior número de casos (50/119), seguido das raças de pequeno (47/119) e médio porte (22/119). As idades dos cães acometidos por neoplasmas testiculares variaram de 10 meses a 18 anos. Aumento de volume testicular foi a manifestação clínica mais comum. Onze cães tinham informações sobre sinais clínicos sugestivos da síndrome da feminilização. Em alguns seminomas intratubulares, foi possível detectar dois locais sugestivos de transformações neoplásicas das células germinativas intratubulares. Leydigomas e principalmente sertoliomas foram neoplasmas com alta variação na morfologia celular,

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

³ Curso de Medicina Veterinária, CCR, UFSM, Santa Maria, RS.

⁴ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM. *Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

ressaltando-se a importância de conhecer suas variações histomorfológicas, principalmente nos casos com arranjos histológicos semelhantes a esses dois tumores. Através deste estudo foi possível estabelecer alguns dos principais aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos dos neoplasmas testiculares diagnosticados num período de 19 anos na área de abrangência do LPV-UFSM.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cães, neoplasmas testiculares, aspectos clínicos, morfologia.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos apontam os neoplasmas testiculares como os tumores mais comuns do trato genital de cães machos (Cotchin 1960, Hayes & Pendergrass, 1976, Sapierzyński et al. 2007). Nesses estudos, os tipos mais comumente diagnosticados são os tumores de células germinativas (seminomas) e do estroma do cordão sexual (sertoliomas e leydigomas). Os aspectos clínicos de maior relevância associados incluem o crescimento expansivo, com marcada distensão dos testículos afetados e as síndromes clínicas. Alguns autores apontam o criptorquidismo como fator de risco para ocorrência desses neoplasmas (Hayes & Pendergrass, 1976, Madewell 1981, Hayes et al. 1985, Yates et al. 2003, Ortega-Pacheco et al. 2006). Outros fatores descritos, contudo, menos comprovadamente associados incluem a predisposição racial, hérnias inguinais e a ação de agentes terapêuticos e herbicidas (Hayes et al. 1985, Hayes et al. 1990, Kesley et al. 1998).

Os padrões histopatológicos desses neoplasmas há muito tempo são conhecidos (Nielsen & Lein 1974, Maclachlan & Kennedy 2002). Contudo, alguns tumores são infrequentes, de difícil diagnóstico e com particularidades histológicas pouco descritas (Patnaik & Mostofi 1993, Reis-Filho et al. 2004). Desta forma, estudos retrospectivos incluindo a reavaliação de casos podem ser úteis no estabelecimento da prevalência em cães, na caracterização de fatores associados a ocorrência desses tumores, bem como na descrição de particularidades histológicas pouco comuns que podem ter relevância diagnóstica e na compreensão da patogênese dos neoplasmas testiculares. O presente estudo teve por objetivo caracterizar as raças/portes e idades dos cães afetados, bem como a prevalência e os aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos dos neoplasmas testiculares caninos através de um levantamento retrospectivo dos protocolos de biópsias diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) em um período de 19 anos (2000 - 2018).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidos dados referentes às raças e idades dos cães acometidos e os aspectos clínicos e macroscópicos a partir do arquivo de laudos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM) em um período de 19 anos (2000 a 2018). Esses dados são provenientes dos espécimes de biópsias dos cães machos recebidos nesse período. Do total de casos, foram contabilizados os cães com neoplasmas testiculares, bem como o total de neoplasmas diagnosticados em diferentes órgãos nesses cães.

As raças foram agrupadas de acordo com o porte em: pequeno porte (raças até 10kg), médio porte (raças entre 11-20kg) e grande porte (raças acima dos 20kg). Nesta última categoria (raças de grande porte), também foram incluídas as raças de porte gigante (adaptado de Folge 2009). As idades dos cães com porte racial definido foram divididas em quatro grupos etários (jovens, adultos, adultos sênior e geriátricos) e estão demonstradas no Quadro 1 (adaptado de Gardner & McVety, 2017). Devido à falta de informações sobre o peso nos protocolos de biópsias, os cães sem raça definida (SRD) e, portanto, sem porte racial estabelecido, não foram agrupados nas categorias de porte anteriormente descritas. Consequentemente eles não foram subdivididos nos grupos etários.

Quanto às manifestações clínicas, foram contabilizados os cães com histórico de aumento de volume testicular ou escrotal, dor à palpação, criptorquidismo, hérnias inguinais e quanto à ocorrência de síndromes clínicas (feminilização). Os aspectos macroscópicos foram revisados com base na apresentação dos neoplasmas (nódulos ou massas) na distribuição (neoplasmas únicos/focais ou múltiplos/multifocais) e quanto à consistência, cor e aspectos secundários (presença de hemorragia, necrose e cistos). Os conceitos de nódulo e massa foram adaptados conforme previamente descrito (Gould et al. 2007). Tumores com até 3,0 cm de diâmetro foram tidos como nódulos, enquanto os maiores de 3,0 cm foram denominados de massas.

Para reavaliação histopatológica, foram confeccionadas novas lâminas dos neoplasmas testiculares previamente diagnosticados. Os casos foram recortados em seções de 3,0µm, corados por hematoxilina e eosina, reavaliados e reclassificados de acordo com a classificação histológica dos tumores do trato genital dos animais domésticos da Organização Mundial de Saúde (OMS 1998) (Kennedy et al. 1998). Quando aplicável, os tumores com particularidades morfológicas sugestivas de tipos específicos foram corados com técnicas histoquímicas, afim de melhor evidenciar esses aspectos.

RESULTADOS

Prevalência dos cães acometidos e frequência dos neoplasmas testiculares

No período de estudo (2000-2018) foram contabilizados 3.323 casos de biópsias em cães machos. Desses cães submetidos a biópsias, 1.900 tinham um ou mais diagnósticos de neoplasmas, contabilizando 2.118

neoplasmas em diferentes órgãos. A prevalência de cães com neoplasmas testiculares foi de 213/1.900 casos, perfazendo 11,2% de todos os cães acometidos por neoplasias. Desses 213 cães, 190 tinham blocos de parafina disponíveis para reavaliação histopatológica. Considerando que esses 190 cães tinham mais de um neoplasma testicular, um total de 220 neoplasmas foram diagnosticados. Em ordem decrescente, os neoplasmas testiculares mais frequentes na rotina diagnóstica foram: seminomas (88/220; 40%), leydigomas (64/220; 29,1%), sertoliomas (61/220; 27,7%), e o tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS; 07/220; 3,2%).

Em 30 dos 190 cães (15,8%), mais de um tipo de neoplasma testicular foi diagnosticado. Dezesesseis tiveram os diferentes neoplasmas confinados ao mesmo testículo. Em 10 cães, ambos os testículos foram acometidos. Nos outros quatro, diferentes tumores acometiam ambos os testículos. Seminomas e leydigomas foi a combinação de neoplasmas mais frequente, sendo observada em 16 cães, seguido de seminomas e sertoliomas (12/190) e dos sertoliomas e leydigomas (2/190).

Caracterização das raças e idades

Dos 190 casos reavaliados, 119 cães estiveram distribuídos em 25 raças, 60/190 eram sem raça definida (SRD) e em 11/190, a informação referente à raça não foi obtida. As raças de grande porte tiveram o maior número de casos (50/119), seguido das raças de pequeno (47/119) e médio porte (22/119). Em ordem decrescente, as raças mais acometidas foram: Poodle (22/119), Cocker Spaniel (16/119), Boxer (12/119), Pastor Alemão (11/119), Pinscher (09/119), Dachshund (7/119), Labrador Retriever (7/119), Collie (5/119) e Yorkshire Terrier (4/119).

As idades dos 190 cães acometidos por neoplasmas testiculares variaram de 10 meses a 18 anos. Entre os cães com raça definida, os geriátricos e adultos sênior totalizaram a maioria dos casos, enquanto uma menor proporção era de cães adultos e jovens (Fig. 1). Apenas a categoria de pequeno porte teve os neoplasmas distribuídos nos quatro grupos etários. Nessa categoria, a faixa etária dos cães adultos sênior foi a mais acometida. Nas raças de médio porte, a maioria dos tumores foi observada na faixa etária acima dos oito anos, que abrange os cães adultos sênior e geriátricos. Entre os cães de grande porte, o grupo dos geriátricos foi o mais afetado e teve um número expressivo de casos em comparação aos cães dos outros grupos etários. A Figura 2 demonstra o número de cães acometidos por neoplasmas testiculares nos quatro grupos etários de acordo com as três categorias de porte racial. Em 7/190 cães, incluindo três cães com raça definida, as informações referentes às idades não estavam disponíveis. As médias de idade por tipo de tumor foram de 10,8 anos para os seminomas (variação de 10 meses a 15 anos), de 10,6 anos para os sertoliomas (variação de 4 a 18 anos), de 11,2 para leydigomas (variação de 2 a 17 anos), de 12,4 anos para TMCGCS (variação de 6 a 15 anos) e de 10,5 anos para os cães com mais de um tipo de neoplasma (variação de 5 a 15 anos).

Aspectos clínicos

Aumento de volume testicular foi a manifestação clínica mais comum, sendo relatada em 92 (48,4%) dos 190 cães. Aumento de volume escrotal (espessamento da pele) e dor à palpação foram relatados em 14/190 (7,4%) e 6/190 (3,2%) casos, respectivamente. Em onze cães (5,8%) havia informação nos protocolos de biópsias de que eles manifestaram sinais clínicos sugestivos da síndrome da feminilização. Desses, 4/11 tiveram ginecomastia, e 4/11 desenvolveram lesões de pele, que se caracterizaram por alopecia, espessamento e hiperpigmentação, sendo geralmente bilaterais simétricas, nas regiões de abdômen, tórax e membros. Nos outros 3/11, ambas alterações anteriormente descritas (ginecomastia e lesões de pele) foram relatadas. Sertoliomas foram diagnosticados em 7/11 cães, três foram acometidos pela combinação de seminomas e sertoliomas e um teve o TMCGCS.

Cinquenta e um (23,2%) dos 220 neoplasmas foram observados em 43 (22,6%) cães criptorquidas. O seminoma foi o tumor mais frequente entre os cães criptorquidas (15/43), seguido dos sertoliomas com 13/43 casos. Uma menor proporção dos cães com testículos criptorquidas tiveram combinações de neoplasmas (8/43), bem como leydigomas (4/43) e o TMCGCS (3/41). A localização dos testículos ectópicos, de acordo com os tipos de neoplasmas, está demonstrada no Quadro 2. Em três cães foi relatada ocorrência de hérnias, sendo dois casos de hérnias perineais e um caso de hérnia inguino-escrotal.

Aspectos macroscópicos e histopatológicos.

Os aspectos macroscópicos e histopatológicos serão descritos conforme a sequência decrescente do número de cães afetados por um único tipo de neoplasma (n=160).

Seminomas (n=60)

As massas corresponderam à maioria dos neoplasmas (18/60) e tinham de 5,0 a 10 cm de comprimento, eram macias ou firmes, branco-avermelhadas, com áreas de hemorragia e por vezes obliteravam totalmente o parênquima testicular (Fig.3). Nódulos únicos ou múltiplos corresponderam a 16/60 dos casos e variaram de 0,4 a 3,0 cm comprimento, sendo geralmente macios, brancos ou amarelos com áreas de hemorragia. Nove 9/60 cães não tiveram alterações macroscópicas e os neoplasmas foram diagnosticados na microscopia. Quatorze dos

sessenta seminomas tinham o padrão intratubular, 41/60 eram difusos e em 5/60 casos ambos os padrões foram observados. Os tumores difusos eram constituídos por mantos de células germinativas neoplásicas delineados por estroma fibrovascular escasso (Fig. 4). As células eram redondas ou poligonais e tinham citoplasma moderado e eosinofílico. Seus núcleos tinham cromatina vesicular ou finamente pontilhada e nucléolos conspícuos. Mitoses eram frequentes. Infiltrados perivasculares de linfócitos, bem como necrose celular individual e macrófagos com citoplasma vacuolizado foram achados comuns nos seminomas difusos.

Quanto aos seminomas intratubulares, a maioria dos tumores obliteravam completamente os lúmens dos túbulos seminíferos. Contudo, em alguns casos, foi possível detectar dois locais sugestivos de transformações neoplásicas. No primeiro e mais comum, as células tumorais estavam localizadas no centro (compartimento luminal) dos túbulos seminíferos e, geralmente, eram perifericamente delineadas por células germinativas (espermátides redondas, espermatócitos e espermatogônias), bem como células estromais (Sertoli), sem evidências de transformações neoplásicas (Fig. 5). No segundo padrão de localização de possíveis transformações neoplásicas, uma ou duas camadas de células neoplásicas foram observadas em justaposição a membrana basal (compartimento basal) e não tinham remanescentes de componentes germinativos ou estromais no lúmen tubular (Fig. 6). Células neoplásicas com aspecto sincicial foi um achado infrequente em alguns dos seminomas intratubulares (Fig.7). Essas eram fusionadas, tinham mais de dez núcleos e eram orientadas em justaposição à membrana basal. Seis dos 60 seminomas eram malignos. Infiltração de células neoplásicas nos lúmens de vasos sanguíneos e linfáticos foi observada em 3/60 cães. Três dos 60 cães tiveram metástases para linfonodos regionais e infiltração de estruturas testiculares adjacentes (túnica albugínea e epidídimo).

Sertoliomas (n=47)

Os nódulos corresponderam à maior parte dos sertoliomas (16/47). Esses tinham de 0,4 a 3,0 cm de comprimento e na grande maioria eram firmes e brancos. Os neoplasmas de maior tamanho formaram massas (n=12) geralmente únicas, com 4,0 a 11 cm de comprimento (Fig. 8). Ao corte, eram firmes ou macias e tinham superfície de corte branca, multilobulada, friável, com áreas de hemorragia. Um achado relativamente frequente, independentemente da apresentação macroscópica e tamanho dos sertoliomas, foram as formações císticas. Essas, eram únicas ou múltiplas e preenchidas por conteúdo gelatinoso marrom ou por sangue.

Na microscopia, 24/47 sertoliomas tinham o padrão intratubular, 9/47 eram difusos e em 14/47 casos ambos os padrões foram observados. Dentre os neoplasmas deste levantamento, os sertoliomas tiveram a maior heterogeneidade quanto ao pleomorfismo celular. Moderada a acentuada reação desmoplásica, bem como hialinização de túbulos seminíferos foram aspectos marcantes e característicos da grande maioria dos sertoliomas. Presença de áreas centrais de necrose delineadas por células de Sertoli neoplásicas foi outro achado característico, principalmente nas proliferações de maior densidade celular. As células neoplásicas estavam dispostas em cinco arranjos histológicos distintos e, por vezes, alguns tumores tinham mais de um arranjo celular. A seguir estão descritos os cinco arranjos histológicos observados nos sertoliomas: a) tumores de células pequenas, geralmente poliédricas, com limites celulares pouco distintos, núcleos pequenos e hipercromáticos. Nesse arranjo, os sertoliomas tinham crescimento expansivo, com distensão e rompimento da membrana tubular, bem como áreas de hemorragia e necrose contíguas com as formações neoplásicas (Fig. 9), b) sertoliomas com células neoplásicas agrupadas em túbulos de diferentes tamanhos, por vezes com rompimento da membrana basal. As células tinham citoplasma escasso, limites indistintos e núcleos redondos com cromatina esparsa e hipocromática (Fig. 10). Hemorragia e necrose de células de Sertoli e germinativas no centro dessas formações foram frequentes, principalmente nas proliferações de maior tamanho; c) neoplasmas com células colunares de limites celulares indistintos, levemente vacuolizadas, com núcleos em posições variadas foram observadas em paliçada e livres nos lúmens dos túbulos (Fig. 11). Nesse arranjo, as células eram confinadas em túbulos de diferentes tamanhos, por vezes com rompimento da membrana basal; d) sertoliomas com células inteiramente fusiformes, tinham citoplasma abundante, eosinofílico e limites celulares moderadamente distintos (Fig. 12). Seus núcleos eram fusiformes, com cromatina esparsa e hipocromática. Nesse arranjo, os tumores tinham crescimento expansivo, escassos remanescentes de túbulos e moderada reação desmoplásica. Células orientadas em justaposição a membrana basal foram observadas em alguns dos casos; e) constituídos de células vacuolizadas, com citoplasma escasso, eosinofílico e geralmente intratubulares, com núcleos achatados pela compressão dos vacúolos (Fig. 13). Nesse arranjo, os tumores tinham de leve a moderada reação desmoplásica. Não foram observados sertoliomas malignos.

Leydigomas (n=46)

A maior parte dos tumores 32/46, foi descrita como nódulos, únicos ou múltiplos, com 0,4 a 2,5 cm de diâmetro, macios, branco-amarelados ou vermelhos, bem delimitados e por vezes com áreas de hemorragia (Fig. 14). Três leydigomas formaram massas de 3,0 a 10 cm de comprimento, com moderada a acentuada obliteração do parênquima testicular.

Na microscopia, os padrões sólido-difuso e cístico-vascular foram os mais comuns com 13/46 e 12/46 casos, respectivamente (Fig. 15). Um único cão teve o padrão pseudoadenomatoso (Fig. 16). Nos outros 20/46

cães, mais de um padrão histológico foi observado simultaneamente. A maior parte era dos tipos sólido-difuso e cístico-vascular, enquanto uma menor proporção dos tumores era formada por um desses padrões junto com o pseudoadenomatoso.

A morfologia das células intersticiais neoplásicas foi um pouco variável. Contudo, a maior parte dos tumores tinha células poligonais, com citoplasma eosinofílico, finamente vacuolizado e núcleos redondos com cromatina condensada e hiper cromática. Alguns neoplasmas tinham células com macrovacúolos que achatavam e deslocavam os núcleos periféricamente, bem como células desprovidas de vacúolos, geralmente grandes, poliédricas ou colunares. Uma alta proporção dos tumores eram encapsulados e tinham estroma fibrovascular escasso. Acúmulos de hematoidina e ninhos de células colunares orientadas em paliçada, circunjacentes a vasos sanguíneos também foram achados relativamente frequentes. Um leydigoma deste levantamento era maligno. Nesse caso, o neoplasma obliterava o parênquima testicular e tinham alto índice mitótico, pleomorfismo e áreas de necrose. Múltiplas metástases cutâneas e em outros órgãos foram observadas.

Tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS) (n=7)

A apresentação macroscópica dos TMCGCS variou entre nódulos e massas, eram únicos ou múltiplos, firmes e brancos com 2,0 a 9,0 cm de comprimento e por vezes obliteravam o parênquima testicular (Fig. 17). Na microscopia, grau variável de células germinativas neoplásicas interpostas ou circundadas por células de Sertoli neoplásicas foi o achado mais característico dos TMCGCS (Fig. 18). Hialinização de túbulos, moderada reação desmoplásica e predomínio de um dos componentes celulares também foram achados frequentes. Em 5/7 casos, as células de Sertoli foram mais abundantes, enquanto 2/7 casos tiveram predomínio de células germinativas. No componente germinativo, as células eram redondas ou poligonais, com citoplasmas escasso, eosinofílico e tinham núcleos vesiculares ou com cromatina finamente pontilhada e hiper cromática. As células de Sertoli geralmente eram fusiformes, com citoplasma eosinofílico e núcleos ovais ou colunares. Mitoses eram infrequentes e foram mais comuns no componente germinativo. Em dois casos, foram observados em meio às formações neoplásicas, espaços circulares com material homogêneo, amorfo, hialino e eosinofílico, fortemente PAS-positivo, circundados por células de Sertoli (corpúsculos de Call-Exner) (Fig. 19). Em um cão acometido por TMCGCS maligno, foi observada infiltração de células germinativas neoplásicas nos lúmens de vasos sanguíneos e linfáticos.

DISCUSSÃO

O presente estudo revisou 220 (10,4%) tumores testiculares diagnosticados dentre 2.118 neoplasmas de cães machos. Semelhante ao observado por outros autores (Sapierzyński et al. 2007, Liao et al. 2009), os seminomas foram os neoplasmas mais frequentes, seguidos de proporções aproximadas entre leydigomas e sertoliomas. Em um estudo realizado na Eslovênia, 206 (10,4%) tumores testiculares foram diagnosticados em um total de 1.975 neoplasmas que acometeram cães machos; o seminoma foi o mais frequente, enquanto que o TMCGCS foi observado em um número reduzido de cães (Svara et al. 2014), da mesma forma que no presente levantamento. Contudo, em outros estudos, tumores originados de elementos estromais (sertoliomas e/ou leydigomas) têm sido mais comumente diagnosticados que os de células germinativas (seminomas) (Hayes & Pendergrass 1976, Grieco et al. 2008, Argenta et al. 2016). Vale ressaltar que leydigomas foram os neoplasmas mais frequentes em uma pesquisa com essa temática realizada no Brasil a partir de necropsias de cães (Santos et al. 2000). Diferentemente do observado em humanos, onde a maioria dos tumores testiculares são originados do componente germinativo (Bosl & Motzer 1997), os estudos em cães apresentam variações na frequência de ocorrência dos diferentes tipos de neoplasmas testiculares. Possíveis fatores que influenciariam nessa variação incluem a origem das amostras (necropsias e/ou biópsias), se incluem somente casos clínicos ou também oriundas de amostras de castração por conveniência, dentre outros fatores não estabelecidos.

Este estudo permitiu retratar o perfil dos 190 casos estudados, onde a grande maioria dos cães eram de raça definida (distribuídos em 25 raças), que as raças de grande porte tiveram o maior número de casos, seguido das raças de pequeno e médio porte. Os cães geriátricos perfizeram o grupo etário mais acometido entre os cães com raça definida, seguidos de uma alta proporção dos adultos sênior. Estes resultados são somente demonstrativos deste grupo de 190 cães analisados, não permitindo inferir predisposições da população canina no geral. Alguns estudos têm descrito algumas raças específicas (dentro das de pequeno e grande porte) como de alto risco para ocorrência de neoplasmas testiculares (Liao et al. 2009, Nodtvedt et al. 2010). A literatura também aponta que cães idosos são propensos ao desenvolvimento de alterações degenerativas nos túbulos seminíferos, bem como neoplasmas testiculares (James & Heywood 1979, Lowseth et al. 1990, Santos et al. 2000).

O sertolioma foi o neoplasma mais frequente entre os cães deste estudo com sinais clínicos de hiperestrogenismo. Esses achados corroboram com os descritos por outros autores, nos quais em 25 a 50% dos cães acometidos por sertoliomas, essa síndrome caracterizou-se por alopecia simétrica não pruriginosa, hiperpigmentação, ginecomastia, galactorreia, prepúcio pendular e atratividade a outros cães machos (Siegel et al. 1967, Sanpera et al. 2002, Paepe et al. 2016). Em um estudo, 65 de 318 cães (20%) com neoplasmas testiculares desenvolveram sinais clínicos de disfunções hormonais (hiperestrogenismo) (Cotchin 1960). Importante ressaltar que cães acometidos pela combinação seminomas-sertoliomas ou por TMCGCS também manifestaram síndrome de feminilização neste levantamento, porém com menor frequência.

Cães criptorquidas podem ser até 14,3 vezes mais propensos ao desenvolvimento de neoplasmas testiculares (Ortega-Pacheco et al. 2006). Em um estudo, mais da metade dos neoplasmas testiculares diagnosticados 52/96 (54,2%) foram observados em 45 cães com testículos criptorquidas (Liao et al. 2009). Esses resultados divergem do observado no presente estudo, no qual pouco menos de um quarto (51/220; 23,2%) dos neoplasmas acometeram 43 cães criptorquidas. Menores proporções de neoplasmas testiculares em cães criptorquidas também foram observadas por outros autores (Hayes & Pendergrass 1976). Seminomas e sertoliomas foram os neoplasmas mais frequentes nos 43 cães criptorquidas, corroborando com o previamente descrito (Hayes et al. 1985, Argenta et al. 2016). As características macroscópicas observadas nos seminomas neste estudo eram semelhantes às descritas na literatura (Agnew & Maclachlan 2017).

Dentre os cães com seminomas, a maioria foi acometida por seminomas difusos. Contrariando esse achado, em outros levantamentos, os seminomas intratubulares corresponderam à maior parte dos tumores diagnosticados (Dow 1962, Svava et al. 2014). Uma possível razão para essa diferença talvez esteja nos tipos de amostras analisadas (espécimes de biópsias e/ou casos de necropsias). Em um desses estudos (Dow 1962), uma grande parte dos tumores não tinha lesões visíveis durante a necropsia, sendo apenas diagnosticados na microscopia.

Dois tipos de seminomas em humanos (clássico e espermatocítico) são reconhecidas com base em suas células de origem (Mostofi & Sesterhenn 2004, Bahrami et al. 2007). Em cães, estudos histomorfológicos e imuno-histoquímicos apontam que a maioria dos seminomas caninos tem patogênese semelhante aos seminomas espermatocíticos humanos (Bush et al. 2011, Thorvaldsen et al. 2012). Corroborando essa hipótese, neste estudo foi possível sugerir dois prováveis locais de transformações neoplásicas com base na avaliação morfológica detalhada dos seminomas intratubulares. Nesses casos, a maioria das transformações neoplásicas foram observadas no centro dos túbulos seminíferos, a partir de células germinativas mais diferenciadas, principalmente espermatídes. Alguns tumores tinham uma camada de células neoplásicas orientadas em justaposição à membrana basal. Nesses casos, não foi possível inferir se as transformações neoplásicas advêm de espermatogônias ou de células germinativas atípicas equivalentes às células do carcinoma *in situ*, conforme demonstrado por outros autores (Grieco et al. 2007).

Quarenta e sete cães foram acometidos unicamente por sertoliomas. Alta heterogeneidade na morfologia e arranjo celulares foi um achado frequente nos sertoliomas aqui avaliados, independentemente do padrão histopatológico (intratubular ou difuso). Contudo, a literatura dispõe de poucos estudos aprofundados sobre as particularidades histológicas desse neoplasma que permita ainda subclassificá-los de acordo com essas características celulares (Cotchin 1960, Dow 1962). Estudos comparativos entre características histomorfológicas como as aqui descritas e marcadores imuno-histoquímicos poderiam ser úteis na determinação de uma possível relevância prognóstica de acordo com os diferentes tipos e arranjos celulares observados nesses neoplasmas.

Ao reavaliar os leydigomas, depreendeu-se neste estudo que os padrões histológicos (sólido-difuso, cístico-vascular e pseudoadenomatoso) preconizados pela OMS (Kennedy et al. 1998) são frequentemente observados e que esses tumores também têm uma certa heterogeneidade na morfologia celular. Corroborando com esses achados, outros autores (Cotchin 1960, Dow 1962) observaram que o arranjo celular de alguns leydigomas pode ser semelhante e até mesmo confundido com os observados nos sertoliomas. Portanto, é importante ter em mente a possível variação na morfologia celular, bem como seus diferentes padrões histológicos, visto que casos poucos usuais podem ser erroneamente diagnosticados. Embora alguns painéis imuno-histoquímicos estejam sendo utilizados para auxiliar no diagnóstico de neoplasmas testiculares, a ausência de imunomarcadores específicos para leydigomas (Owston & Ramos-Vara 2007) reforça a importância da observação morfológica detalhada para a acurácia diagnóstica desse neoplasma. No presente estudo, os padrões sólido-difuso e cístico-vascular foram os mais frequentes, seguidos de poucos casos do padrão pseudoadenomatoso. Formas malignas de leydigomas são raramente descritas na literatura, sendo alvo de publicações recentes (Togni et al. 2015, Canadas et al. 2016, Kudo et al. 2019) e destacando a ocorrência de metástases, incluindo múltiplas metástases cutâneas (Canadas et al. 2016, Kudo et al. 2019). O único leydigoma maligno deste levantamento foi relatado em outra publicação (Nascimento et al. 2019).

Sete cães foram diagnosticados com TMCSCS. Semelhante ao observado por outros autores, no geral, esse neoplasma é pouco frequente nos estudos retrospectivos de tumores testiculares caninos (Patnaik & Mostofi 1993, Svava et al. 2014). De acordo com Kennedy et al. 1998, não é conhecido se de fato esse neoplasma é raro ou suficientemente analisado a ponto de ser diagnosticado. Apenas um estudo, descreveu algum critério histológico indicativo de malignidade, o qual se caracterizou por infiltração de células germinativas em estruturas testiculares adjacentes (Patnaik & Mostofi 1993). Alguns estudos têm utilizado de diversos marcadores celulares na caracterização imuno-histoquímica desses tumores. Essa técnica tem se mostrado uma excelente ferramenta no diagnóstico de TMCSCS frente a sua alta complexidade diagnóstica (Owston & Ramos-Vara 2007, Ramos-Vara & Miller 2009, Banco et al. 2015). Nos cães deste levantamento, esse neoplasma caracterizou-se por graus variáveis de associação entre células germinativas e de Sertoli neoplásicas, o que os torna verdadeiros desafios diagnósticos.

CONCLUSÕES

Através deste estudo foi possível estabelecer a prevalência (11,2%) dos cães acometidos por neoplasmas testiculares na região de abrangência do LPV-UFSM, bem como o perfil desses cães quanto à raça/porte e idade, e a prevalência (10,4%) dos neoplasmas testiculares dentre os demais neoplasmas que acometeram cães machos. Foi possível estabelecer o aumento de volume testicular como a principal alteração clínica observada e que a frequência de cães criptorquidas acometidos foi relativamente baixa (23,2%).

Estabeleceu-se a prevalência dos diferentes subtipos histológicos e observou-se que características de malignidade foram pouco frequentes. O seminoma foi o subtipo mais frequente, o qual teve um predomínio incomum do padrão difuso sobre o intratubular. Também foram observadas características sugestivas de locais de transformações das células germinativas neoplásicas nos seminomas intratubulares, corroborando com a hipótese de que os seminomas caninos possivelmente tem patogênese semelhante à observada nos seminomas espermatozóides humanos.

Leydigomas e principalmente sertoliomas foram neoplasmas com alta variação na morfologia celular, ressaltando-se a importância de conhecer suas variações histomorfológicas, principalmente nos casos com arranjos histológicos semelhantes a esses dois tumores. O TMCGCS foi um neoplasma pouco frequente, observando-se que sua morfologia é de difícil diagnóstico e caracteriza-se por graus variáveis de associação entre células germinativas e de Sertoli neoplásicas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro. H. H. L. Nascimento e A. Santos são bolsistas de doutorado da CAPES. E. C. Lamego e L. A. S. Tondo e são bolsistas de iniciação científica pelo PROBIC-FAPERGS e A. L. Prante é bolsista de iniciação científica pelo PIBIC-CNPq. Os autores agradecem a M. B. Ambrosio e L. M. Eisenhardt pelo suporte técnico.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse com relação à publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Agnew D.W. & MacLachlan N.J. 2017. Tumors of the genital systems, p. 689-722. In: Meuten D.J. (Ed), Tumors in Domestic Animals. 5th ed. John Wiley & Sons, Ames.
- Argenta F.F., Pereira P.R., Caprioli R.A., Vielmo A., Sonne L., Pavarini S.P. & Driemeier D. 2016. Neoplasia testicular em cães no Rio Grande do Sul. *Acta Sci. Vet.* 44: (1413)1-6.
- Banco B., Giudice C., Ghisleni G., Romussi S., Behar D. K., & Grieco V. 2015. Immunohistochemical Study of Mixed Germ Cell Sex Cord Stromal Tumours in 13 Canine Testes. *152: (2-3) 182-187.*
- Bahrami A., Ro J.Y. & Ayala A.G. 2007. An Overview of Testicular Germ Cell Tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 131(8) 1267-1280.
- Bosl G.J. & Motzer R.J. 1997. Testicular Germ-Cell Cancer. *N. Engl. J. Med.* 337(4) 243-253.
- Bush J.M., Gardiner D.W., Palmer J.S., Meyts R.D. & Veeramachaneni D.N.R. 2011. Testicular germ cell tumours in dogs are predominantly of spermatocytic seminoma type and are frequently associated with somatic cell tumours. *Int. J. Androl.* 34: (4pt2) 288-295.
- Canadas A., Romão P. & Gartner F. 2016. Multiple cutaneous metastasis of a malignant leydig cell tumour in a Dog. *J. Comp. Pathol.* 155(2-3):181-184.
- Cotchin E. 1960. Testicular neoplasms in dogs. *J. Comp. Pathol. Ther.* 70:232-248.
- Dow C. 1962. Testicular tumours in the dog. *J. Comp. Pathol. Ther.* 72:247-265.
- Folge B. 2009. Guia Ilustrado Zahar: cães. 2nd ed. Zahar, Rio de Janeiro, p. 52-261.
- Gardner M. 2017. Geriatrics and Fragility. p. 18-19. In: Gardner M. & McVety D. (Eds), Treatment and Care of the Geriatric Veterinary Patient. 1st ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Gould M.K., Fletcher J., Iannettoni M.D., Lynch W.R., Midthun D.E., Naidich D.P. & Ost D.E. 2007. Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer? ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest J.* 132 (3):108-130.

- Grieco, V., Riccardi E., Rondena M., Ciampi V. & Finazzi M. 2007. Classical and spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. *J. Comp. Pathol.* 137(1):41-46.
- Grieco V, Riccardi E, Greppi G.F, Teruzzi F, Iermano V & Finazzi M. 2008. Canine testicular tumors: a Study on 232 dogs. *J. Comp. Pathol.* 138 (2-3) :86-89.
- Hayes H.M. & Pendergrass T.W. 1976. Canine testicular tumors: epidemiologic features of 410 dogs. *Int. J. Cancer.* 18 (4) :482-487.
- Hayes H.M., Wilson G.P, Pendergrass T.W. & Cox V.S. 1985. Canine cryptorchism and subsequent testicular neoplasia: case-control study with epidemiologic update. *Teratology.* 32 (1): 51-56.
- Hayes H.M., Tarone R.E., Casey H.W. & Huxsoll D.L. 1990. Excess of seminomas observed in Vietnam Service U.S. military working dogs. *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (12):1042-1046.
- James R.W. & Heywood R. 1979. Age-related variations in the testes and prostate of beagle dogs. *Toxicology.* 12 (3): 273-279.
- Kennedy P.C., Cullen J.M., Edwards J.F, Goldschmidt M.H., Larsen S., Munson L. & Nielsen S. 1998. Histological classifications of tumors of the genital system of domestic animals, p.17-18. In: World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Vol. IV, Armed Forces Institute of Pathology. Washington D.C.
- Kesley J.L., Moore A.S. & Glickman L.T. 1998. Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiol. Rev.* 20 (2):204-217.
- Kudo T, Kamiie J, Aihara N, Doi M, Sumi A, Omachi T & Shiota K. 2019. Malignant Leydig cell tumor in dogs: two cases and a review of the literature. *J. Vet. Diagn. Invest.* 31(4):557-561.
- Liao A.T., Chu P.Y., Yeh L.S., Lin C.T. & Liu C.H. 2009. A 12-Year Retrospective study of canine testicular tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 71 (7): 919-923.
- Lowseth L.A., Gerlach R.F, Gillett N.A. & Muggenburg B.A. 1990. Age-related changes in the prostate and testes of the Beagle dog. *Vet. Pathol.* 27 (5): 347-353.
- MacLachlan N.J. & Kennedy P.C. 2002. Tumors of the genital system, p. 547-574. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*, 4th ed. A Blackwell Publishing Company, Ames.
- Madewell B.R. 1981. Neoplasms in domestic animals: A review of experimental and spontaneous carcinogenesis. *Yale. J. Biol. Med.* 54 (2): 111-125.
- Mostofi F.K. & Sesterhenn I.A. 2004. Tumours of the Testis and Paratesticular Tissue, p.232-235. In: Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I. & Sesterhenn I.A. (Eds), *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.* IARC Press, Lyon.
- Nascimento L.H.H., Tochetto C., Lucena B.R., Kommers G.D. 2019 Testicular Interstitial Cell Tumor with Disseminated Cutaneous Metastasis in a Dog. *Acta Sci. Vet.* 47:1-5.
- Nielsen S.W. & Lein D.H. 1974. Tumours of the testis. *B. World Health Organ.* 50(1-2): 71-78.
- Nodtvedt A., Gamlem H., Gunnes G., Grotmol T., Indrebo A. & Moe L. 2010. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. *Vet. and Comp. Onco.* 9 (1): p. 45-54.
- Ortega-Pacheco A., Rodriguez-Buenvil J.C., Segura-Correa J.C., Bolio-Gonzalez M.E., Jiménez-Coello M. & Linde Forsberg C. 2006. Pathological conditions of the reproductive organs of male stray dogs in the tropics:

- prevalence, risk factors, morphological findings and testosterone concentrations. *Reprod. Domest. Anim.* 41(5): 429-437.
- Owston M.A. & Ramos-Vara J.A. 2007. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. *Vet. Pathol.* 44 (6): 936-943.
- Paepe D., Hebbelinck L., Kitshoff A. & Vandebecle S. 2016. Feminization and severe pancytopenia caused by testicular neoplasia in a cryptorchid dog. *Vlaams Diergen Tijds.* 85 (4): 197-205.
- Patnaik A.K. & Mostofi F.K.A. 1993. A Clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 Dogs. *Vet. Pathol.* 30 (3):287-295.
- Reis-Filho J.S., Ricardo S., Gärtner F. & Schmitt F.C. 2004. Bilateral gonadoblastomas in a dog with mixed gonadal dysgenesis. *J. Comp. Pathol.* 130(2-3):229-233.
- Ramos-Vara J.A. & Miller M.A. 2009. Immunohistochemical Evaluation of Gata-4 Canine Testicular Tumors. *Vet. Pathol.* 46 (5): 893-896.
- Sanpera N., Masot N., Janer M., Romeo C. & Pedro R. 2002. Oestrogen-induced bone marrow aplasia in a dog with a sertoli cell tumour. *J. Small Anim. Pract.* 43 (8): 365-369.
- Santos R.L., Silva C.M., Ribeiro A.F.C. & Serakides R. 2000. Testicular tumors in dogs: frequency and age distribution. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 52 (1): 25-26.
- Sapierzynski R., Malicka E., Bielecki W., Krawiec M., Osinska B., Sendzicka H. & Sobczak-Filipiak M. 2007. Tumors of the urogenital system in dogs and cats. Retrospective review of 138 cases. *Pol. J. Vet. Sci.* 10 (2): 97-103.
- Siegel E.T., Forchielli E., Dorfman R.I., Brodey R.S. & Prier J.E. 1967. An estrogen study in the feminized dog with testicular neoplasia. *Endocrinology*, 80 (2): 272-277.
- Svara T., Gombac M., Pogorevc E., Plavec T., Zrimsek P. & Pogacnik M. 2014. A retrospective study of canine testicular tumour in Slovenia. *Slov. Vet. Res.* 51 (2): 81-88.
- Thorvaldsen T.E., Nodtvedt A., Grotmol T. & Gunnes G. 2012. Morphological and immunohistochemical characterisation of seminomas in Norwegian dogs. *Acta Vet. Scand.* 54 (1) :1-8.
- Togni A., Rutten M., Rohrer Blei C. & Hurter K. 2015. Metastasized leydig cell tumor in a dog. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 157 (2): 111-115.
- Yates D., Hayes G., Heffernan M. & Beynon R. 2003. Incidence of cryptorchidism in dogs and cats. *Vet. Rec.* 152(16):502-504.

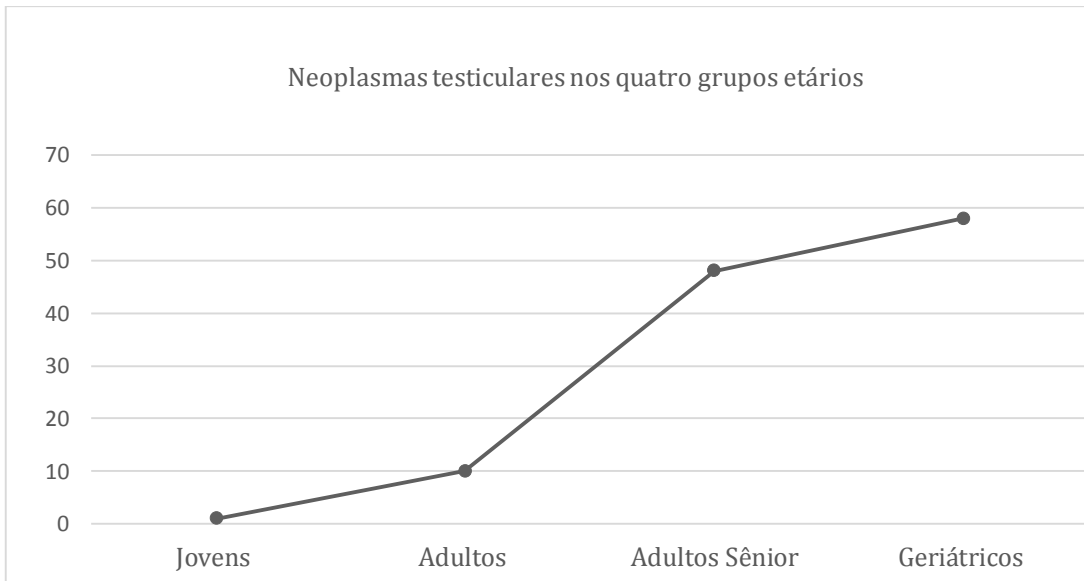


Fig.1. Distribuição dos neoplasmas testiculares nos quatro grupos etários.

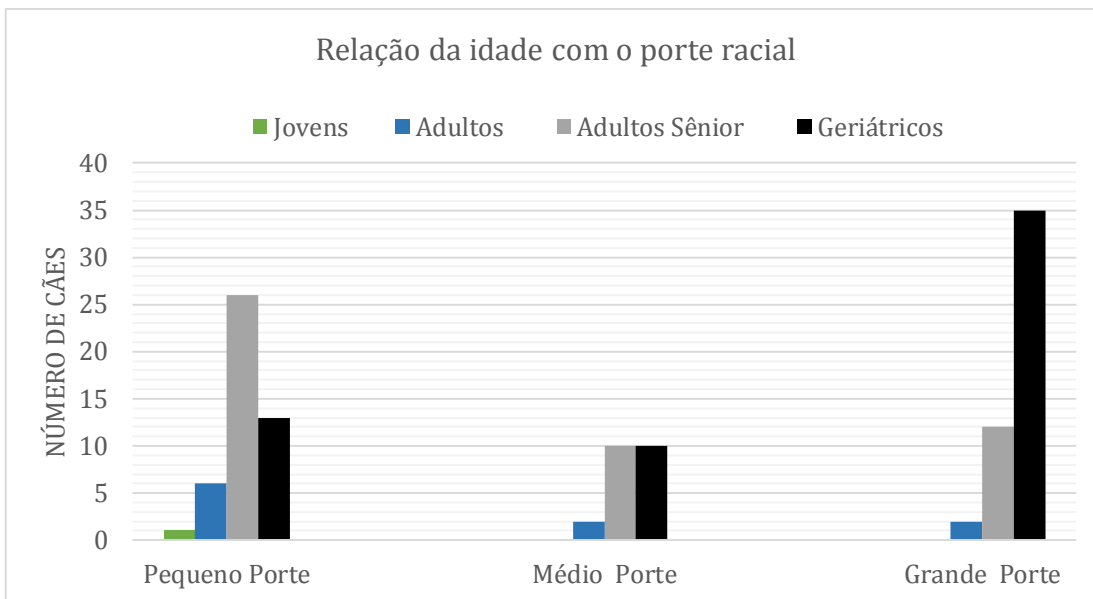


Fig.2. Cães acometidos por neoplasmas testiculares nos quatro grupos etários de acordo com as três categorias de porte racial.



Fig.3. Seminoma. Parênquima testicular obliterado por uma massa, branca, macia, com pequenas áreas de hemorragia.

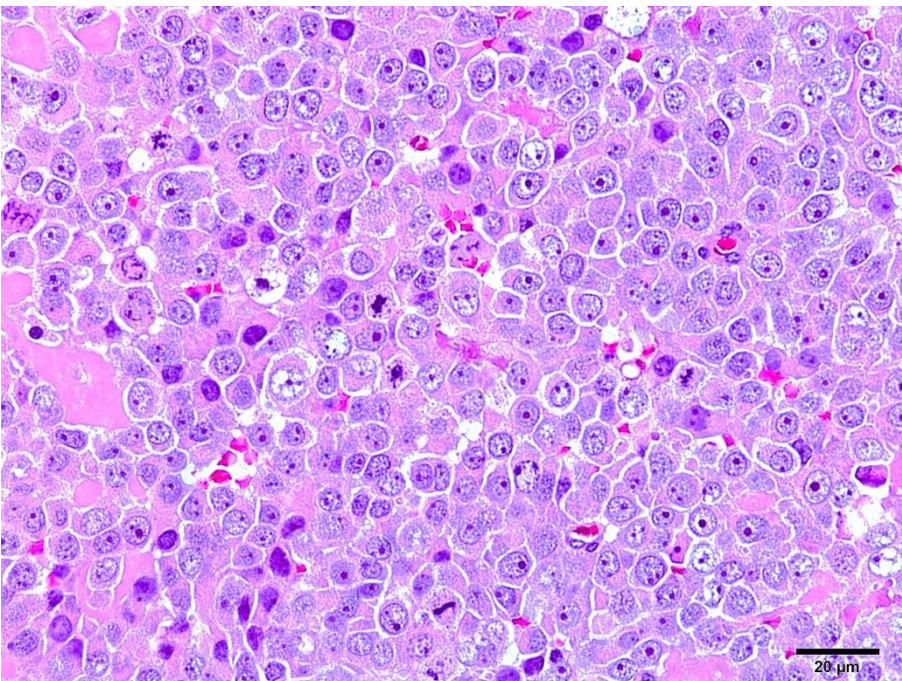


Fig.4. Seminoma difuso. Acentuada anisocitose, anisocariose e alto índice mitótico foi um aspecto marcante nos seminomas difusos (HE).

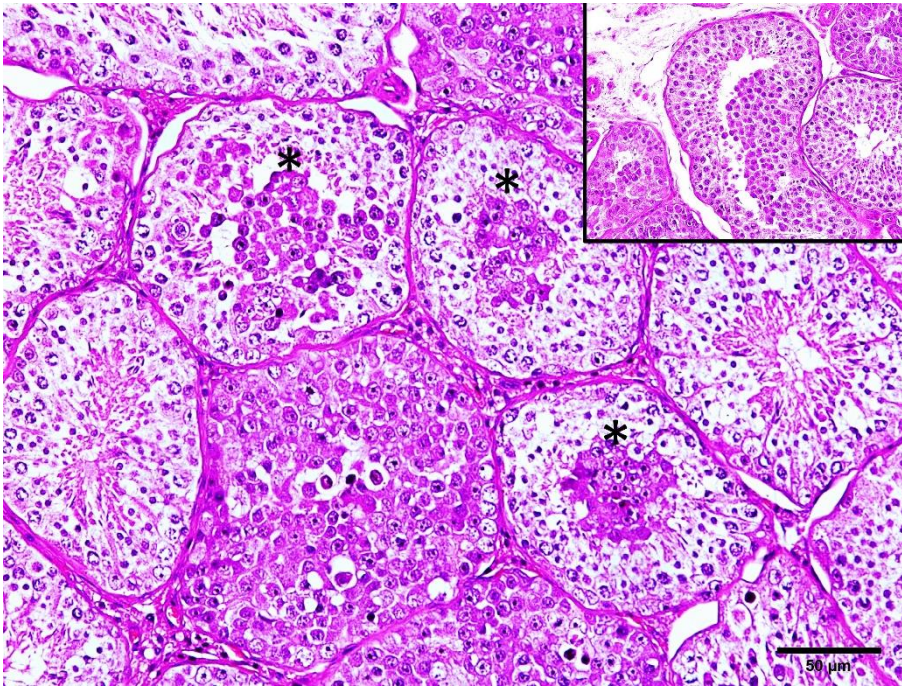


Fig.5. Seminoma intratubular. Células germinativas neoplásicas no centro dos túbulos seminíferos (asteriscos), delimitadas por epitélio germinativo sem evidências de transformações neoplásicas (HE).

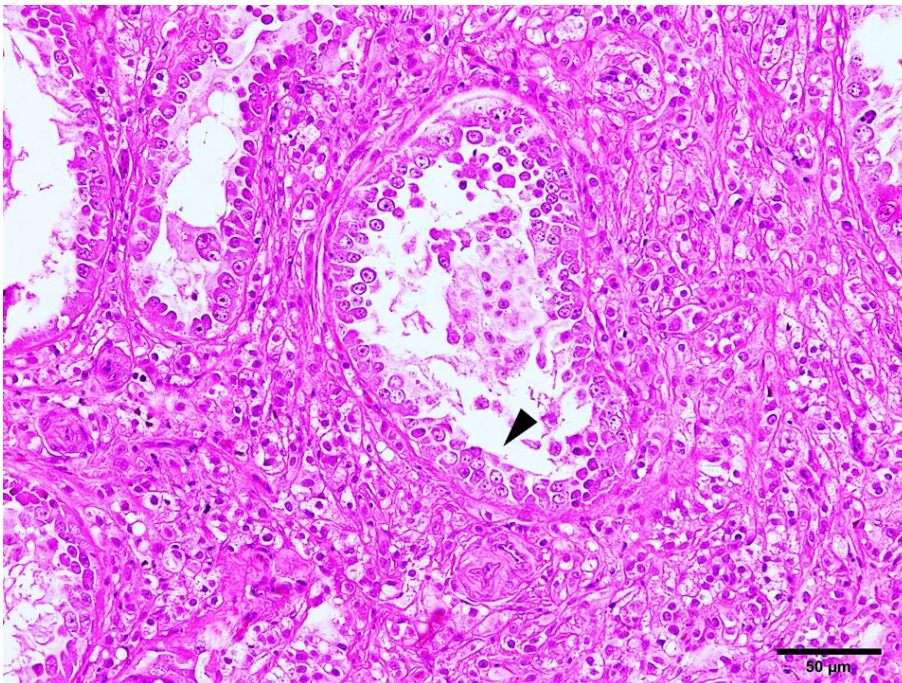


Fig.6. Seminoma intratubular. Células germinativas orientadas em justaposição a membrana basal (cabeça de seta), sem remanescentes de células estromais (Sertoli) no lúmen tubular (HE).

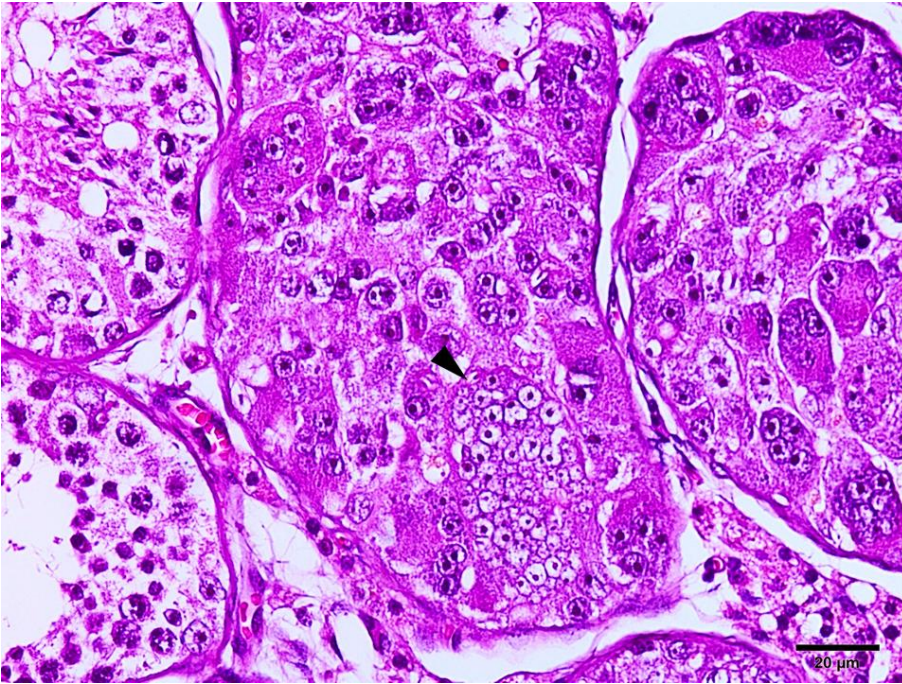


Fig.7. Seminoma intratubular. Túbulo seminífero obliterado por células germinativas neoplásicas. Observe uma célula sincicial orientada em justaposição à membrana basal (cabeça de seta) (HE).



Fig.8. Sertolioma. Massa branca, firme, obliterando parcialmente o parênquima testicular. Contigua a massa neoplásica, há uma formação cística preenchida por conteúdo gelatinoso marrom.

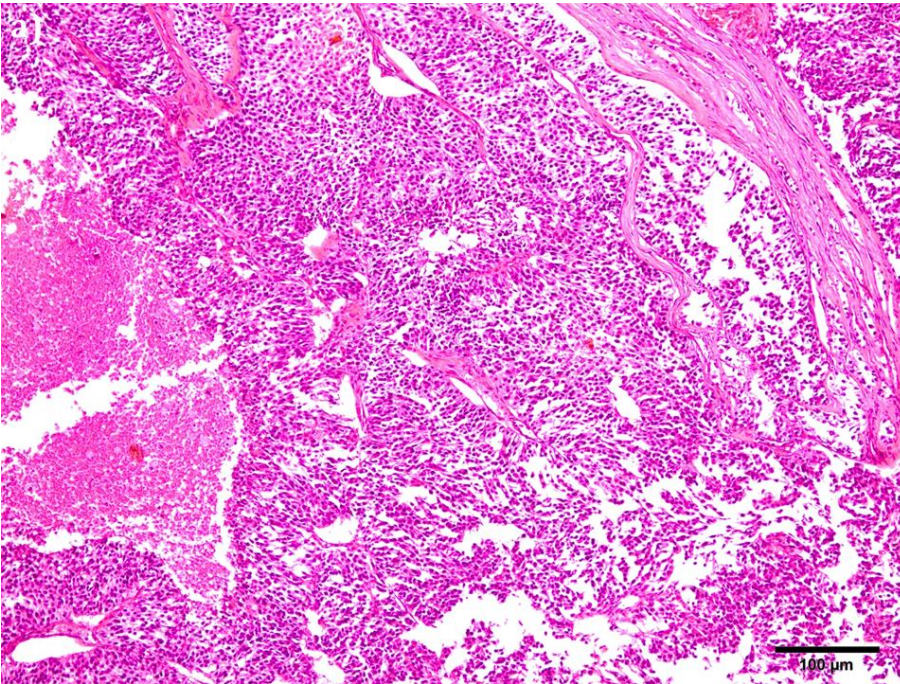


Fig.9. Sertolioma difuso. Células neoplásicas com crescimento expansivo e rompimento da membrana basal tubular (HE).

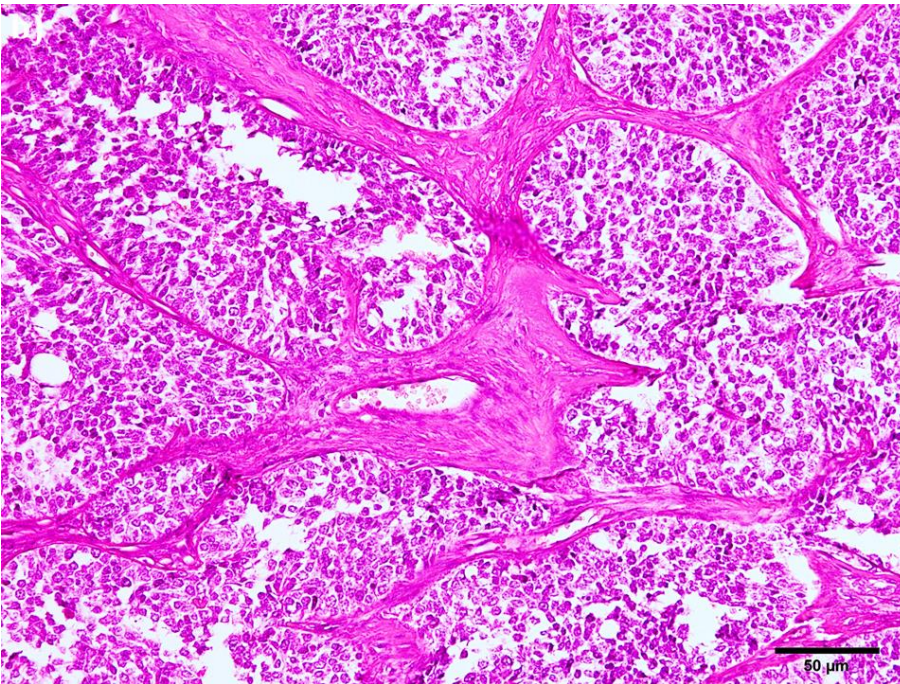


Fig.10. Sertolioma intratubular e difuso. Túbulos de diferentes tamanhos obliterados por células de Sertoli neoplásicas, com rompimento da membrana basal tubular (HE).

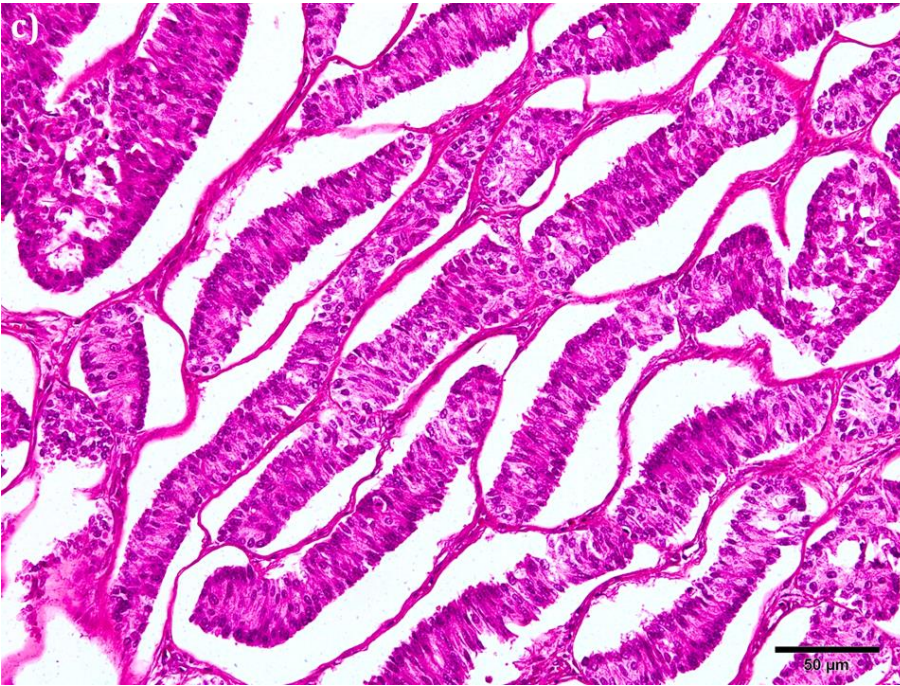


Fig.11. Sertolioma intratubular. Células colunares com núcleos em diferentes posições arranjadas em paliçada, confinadas em túbulos de diferentes tamanhos (HE).

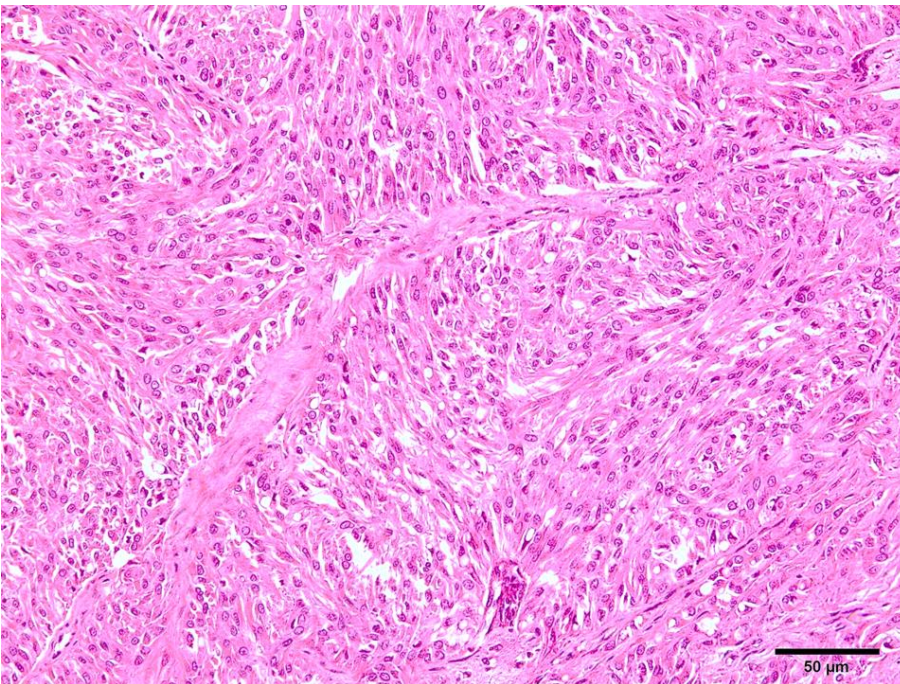


Fig.12. Sertolioma difuso. Tumor de células inteiramente fusiformes. Neoplasma de crescimento expansivo com moderada reação desmoplásica (HE).

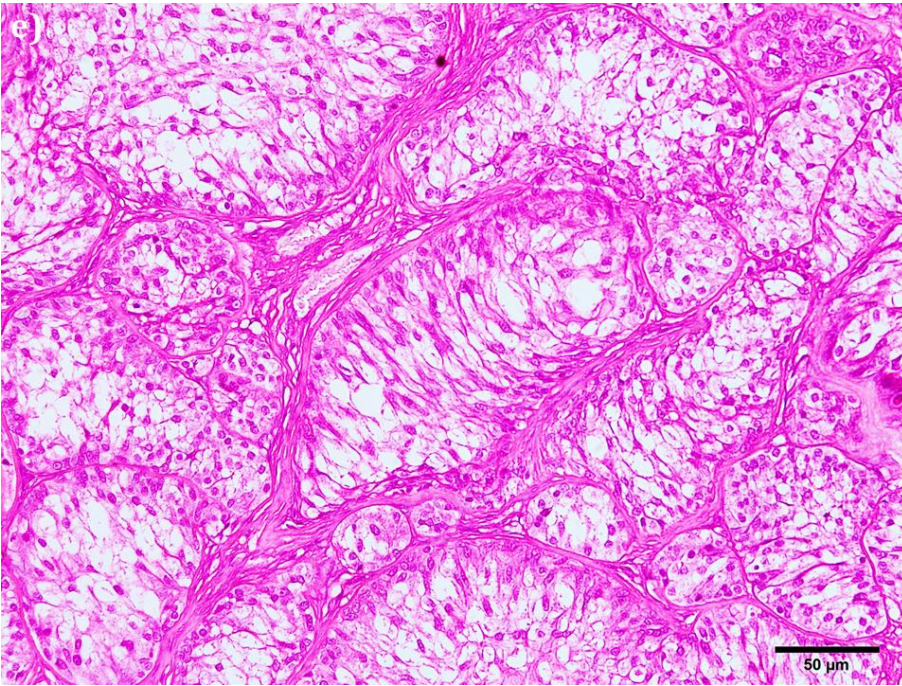


Fig.13. Sertolioma intratubular. Células neoplásicas com citoplasma intensamente vacuolizado confinadas em túbulos de diferentes tamanhos (HE).



Fig.14. Leydigoma. Nódulo bem delimitado, branco avermelhado, macio, com pouca distorção do parênquima testicular.

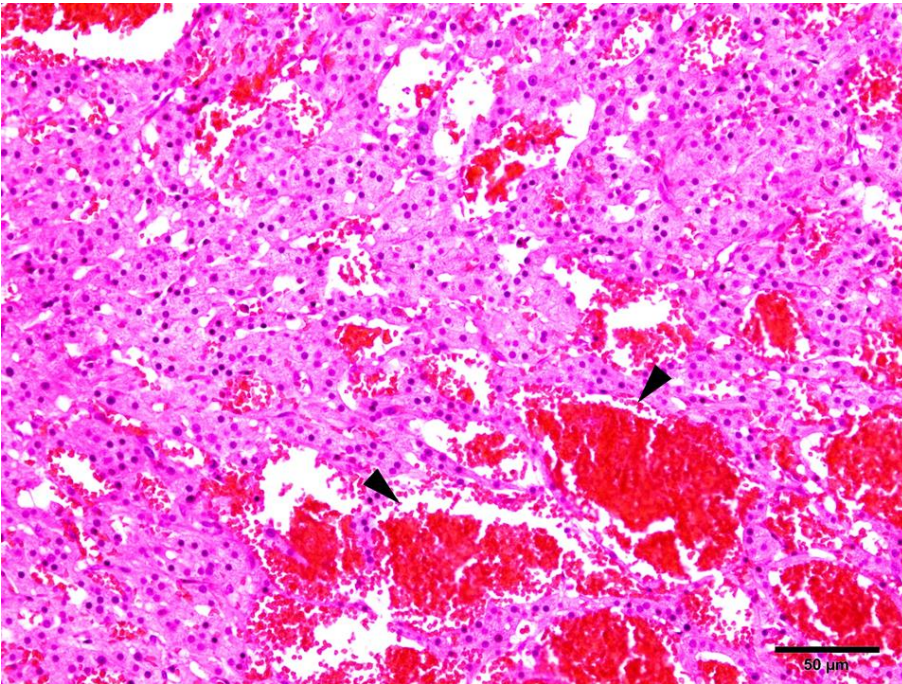


Fig.15. Leydigoma cístico-vascular. Células intersticiais neoplásicas circundando espaços preenchidos por eritrócitos (cabeça de setas) (HE).

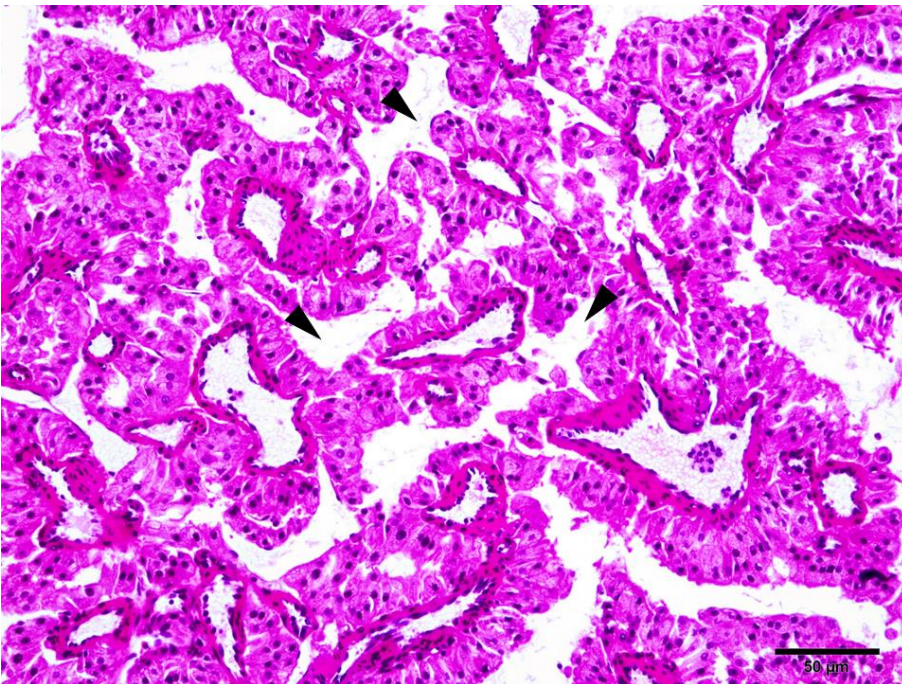


Fig.16. Leydigoma pseudoadenomatoso. Células intersticiais neoplásicas arranjadas em lóbulos, circundando espaços preenchidos por fluido amorfo e eosinofílico (cabeça de setas) (HE).



Fig.17. Tumor misto de células germinativas e do estroma do cordão sexual (TMCGCS). Nódulo focal, branco, macio em meio ao parênquima testicular.

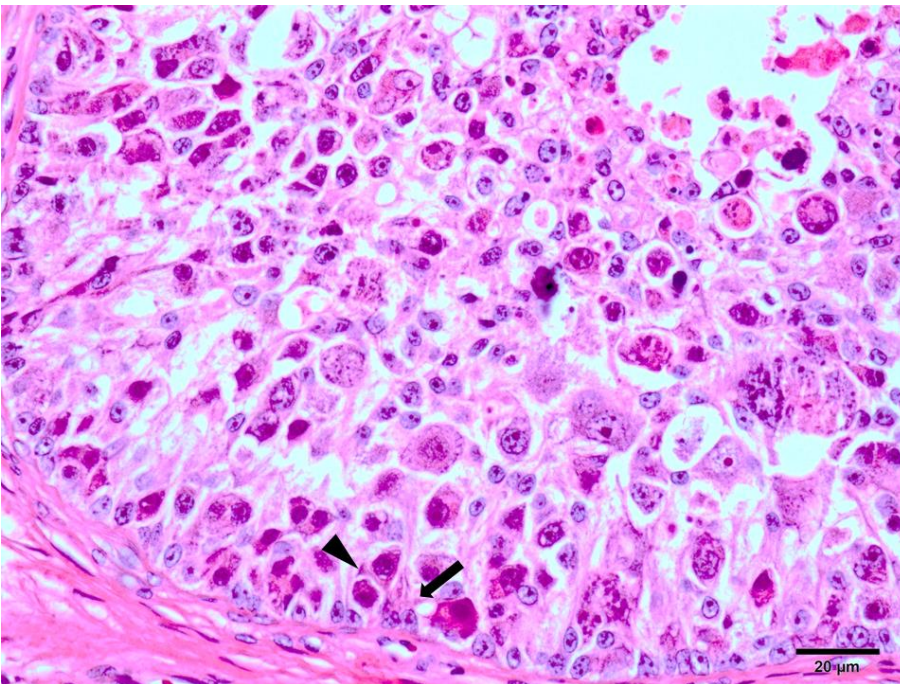


Fig.18. TMCGCS. Células germinativas neoplásicas (cabeça de seta) interpostas por células de Sertoli neoplásicas (seta) (HE).

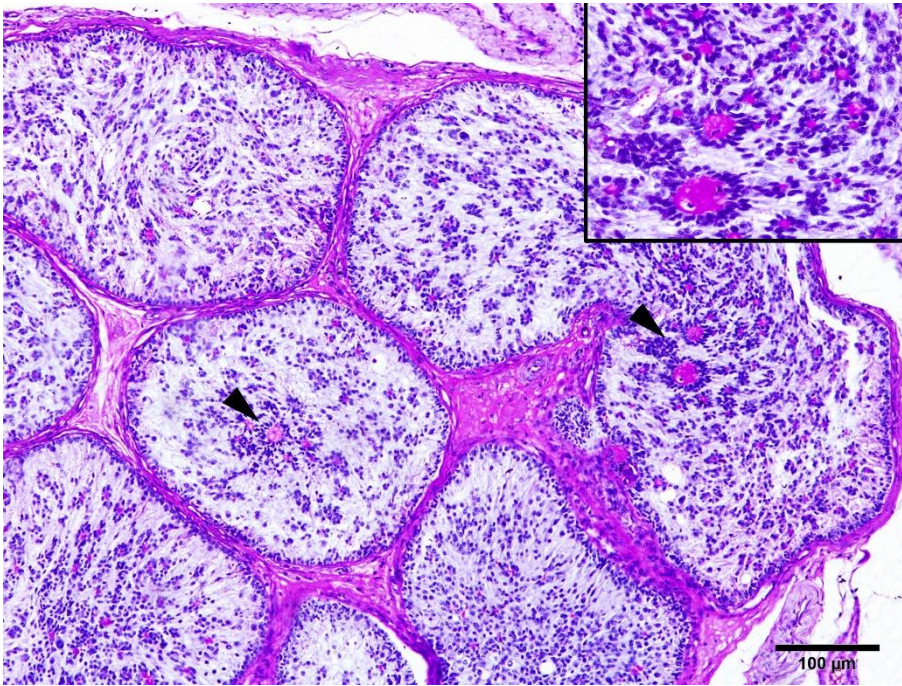


Fig.19. TMCSCS. Observe os corpúsculos de Call-Exner (cabeça de setas) intensamente corados em rosa pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Quadro 1. Idades dos cães com porte racial definido nos quatro grupos etários

	Jovens	Adultos	Adultos Sênior	Geriátricos
Pequeno Porte	1-3 anos	4-8 anos	9-13 anos	Acima de 13
Médio Porte	1-2 anos	3-8 anos	9-11 anos	Acima de 11
Grande Porte	1-2 anos	3-5 anos	6-9 anos	Acima de 9

Adaptado de adaptado de Folge 2009, Gardner & McVety, 2017.

Quadro 2. Localização dos testículos criptorquidas por tipo de neoplasma

	Criptorquida Inguinal	Criptorquida Abdominal	Não Informado	Número de cães
Seminoma	4	3	8	15
Sertolioma	4	-	9	13
Leydigoma	2	2	*	4
TMGCS	2	-	1	3
Sem-Ser	2	-	5	7
Sem-Ley	1	*	*	1
Total	15	5	23	43

-: informação desconhecida. *: sem ocorrência. Sem-Ser: seminoma e sertolioma. Sem-Ley: seminoma e leydigoma.

**4 ARTIGO 2 – TESTICULAR INTERSTITIAL CELL TUMOR WITH
DISSEMINATED CUTANEOUS METASTASIS IN A DOG**

Artigo publicado na Acta Scientiae Veterinariae, 2019, Vol. 47, 01-05.

1 **Testicular Interstitial Cell Tumor with Disseminated Cutaneous Metastasis in a Dog**

2

3 **Harlan Hallamys de Lima Nascimento¹, Camila Tochetto¹, Ricardo Barbosa Lucena² &**

4 **Glaucia Denise Kommers³**

5

6 ¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR),
7 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. ²Laboratório de
8 Patologia Veterinária, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias
9 (CCA), Areia, PB, Brazil. ³Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia,
10 Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM. CORRESPONDENCE: G.D. Kommers
11 [glaukommers@yahoo.com]. Laboratório de Patologia Veterinária, CCS - UFSM. Av. Roraima
12 n. 1000. CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

13

14

15

16

ABSTRACT

1

2 **Background:** Although testicular tumors commonly develop in the genital tract of dogs, only
3 few studies have reported about metastatic testicular tumors in dogs to date. Therefore, the
4 present study aimed to describe the gross, histopathological, and immunohistochemical
5 findings in a dog with metastatic interstitial cell tumor.

6 **Case:** A 6-year-old male Beagle underwent clinical examination due to enlargement of the left
7 testicle and nodules in the skin of the left inguinal region and of the scrotum. The left testicle
8 was cryptorchid (inguinal), and the right testicle was intrascrotal. Both testicles and affected
9 skin fragments were surgically removed. The right testicle was normal in size and did not
10 exhibit gross changes. However, the left testicular parenchyma had been completely replaced
11 by a firm, grayish-to-white neoplastic mass with an irregular surface. The inguinal and scrotal
12 skin fragments were thickened by the neoplastic masses. Histologically, the left testicular
13 parenchyma was completely obliterated by a neoplastic mass consisting of round-to-oval and
14 polygonal cells. The neoplastic cells generally had abundant eosinophilic cytoplasm with
15 indistinct cell limits. The nuclei were round and small, with aggregated chromatin. However,
16 some cells exhibited high degrees of atypia and pleomorphism and large nuclei with granular
17 chromatin. Mitotic figures were observed at high frequencies of up to 11 per high-power field
18 (400×). The mass in the left testicle was diagnosed as malignant interstitial cell tumor. The
19 sections of the inguinal skin and scrotum presented with neoplastic cells similar to those
20 observed in the left testicle, which is consistent with the metastasis of the malignant testicular
21 interstitial cell tumor. On the basis of necropsy, multiple cutaneous and subcutaneous nodules
22 were randomly distributed throughout the body, primarily in the prepuce, head, and limbs.
23 Histological evaluations of the skin nodules, internal iliac lymph nodes, and abdominal skeletal
24 muscles also revealed metastases of the testicular interstitial cell tumor.

1 **Discussion:** The histopathological findings associated with the immunohistochemical results
2 observed in the present case helped in establishing the diagnosis of malignant interstitial cell
3 tumor. Regarding the histological evaluations, although most neoplastic cells exhibited
4 appearances that are characteristic of Leydig cells, several features indicative of malignancy
5 were also observed. In dogs, malignant interstitial cell tumors are rare, and multiple organ
6 metastases have been described. Among the immunohistochemical markers that were
7 examined (calretinin, vimentin, cytokeratin, placental alkaline phosphatase, and octamer-
8 binding transcription factor 3/4), only vimentin staining produced a positive result. In one
9 study, the antibody against vimentin stained both normal Sertoli and Leydig cells and tumors
10 arising from these cells, but not seminomas, which is an important differential diagnosis in the
11 case described in this study. The negativity for placental alkaline phosphatase also allowed to
12 rule out seminoma in the differential diagnosis of the primary tumor. The skin sections (distant
13 metastases) were negative for T and B lymphocytes and macrophages, thereby ruling out
14 possible differential diagnoses, such as lymphomas or histiocytic tumors, among the cutaneous
15 neoplasms. Therefore, this case report described a malignant testicular interstitial cell tumor
16 with an uncommon disseminated pattern of metastases to the skin in a dog.

17 **Keywords:** testicular neoplasia, malignant interstitial cell tumor, diseases of dogs.

18

19

INTRODUCTION

20 According to the latest World Health Organization classification of tumors in domestic
21 animals, primary tumors of the testicles are classified into three types: sex-cord stromal tumors,
22 which include both Sertoli cell tumors (SCTs) and interstitial (Leydig) cell tumors (ICTs);
23 germ cell tumors, which include seminomas, teratomas, embryonal carcinomas, and yolk sac
24 carcinomas; and mixed tumors [9]. ICT is a mesenchymal neoplasm originating from the
25 interstitial Leydig cells located between the seminiferous tubules [1,5]. Most of these tumors

1 are benign; however, cases of malignant forms, although extremely rare, were recorded [2,19].
2 Comparing to ICTs, the veterinary literature most commonly associates seminomas and Sertoli
3 cell tumours with malignant behavior (metastases), as well as with clinical syndromes and
4 cryptorchidism [7,12]. ICTs are unusually associated with these findings. However, in few
5 cases involving dogs, multiple metastases in the skin and skeletal musculature were the main
6 findings observed that were indicative of malignancy [2,19]. The use of ancillary tests for
7 histopathological examination, such as the immunohistochemical (IHC) technique, may
8 contribute to the definitive diagnosis of malignant ICTs. Therefore, the present study aimed to
9 describe the gross, histopathological, and IHC findings in a dog with metastatic ICT.

10

11

CASE

12 A 6-year-old male Beagle underwent clinical examination due to enlargement of the left
13 testicle and nodules in the skin of the left inguinal region and scrotum over a course of
14 approximately 1 month, as observed by the owner. The left testicle was cryptorchid (inguinal),
15 and the right testicle was intrascrotal. Both testicles and affected skin fragments were
16 surgically removed and sent to the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade
17 Federal de Santa Maria. The right testicle was normal in size and did not exhibit gross changes.
18 However, the left testicular parenchyma had been completely replaced by a firm, grayish-to-
19 white neoplastic mass with an irregular surface (Figure 1). The affected skin fragments were
20 thickened by the neoplastic masses, which appeared similar to those of the mass observed in
21 the left testicle. Histologically, the left testicular parenchyma was completely obliterated by a
22 neoplastic mass, consisting of round-to-oval and polygonal cells. The neoplastic cells generally
23 had abundant eosinophilic cytoplasm, sometimes vacuolated, with moderately distinct cell
24 limits (Figure 2). The nuclei were round, peripheral, and small, with aggregated chromatin;
25 however, some cells exhibited high degrees of atypia and pleomorphism and large nuclei with

1 granular chromatin. Mitotic figures were observed at high frequencies of up to 11 per high-
2 power field (400×). Multiple areas of necrosis were also observed. The mass in the left testicle
3 was diagnosed as malignant ICT. Sections of the affected skin presented with neoplastic cells
4 similar to those observed in the left testicle, which were arranged in sheets that infiltrated the
5 superficial and deep dermis. The histological findings were consistent with metastases of
6 testicular ICT. The dog was submitted to euthanasia approximately 1 month after ICT
7 diagnosis due to its extremely poor clinical condition. On the basis of necropsy, multiple
8 cutaneous and subcutaneous nodules (Figures 3 & 4) randomly distributed throughout the
9 body, primarily in the prepuce, head, and limbs, were found. These nodules were firm and well
10 delimited, ranging from 0.8 to 2.0 cm in diameter, and were homogeneously white at the cut
11 surface, and some nodules were ulcerated.

12 The left internal iliac lymph node had been replaced by a 5.0 × 6.0 × 2.5 cm white mass. The
13 right internal iliac lymph node was firm and slightly enlarged, and its cut surface was
14 characterized by brown areas that were interspersed with white areas. The muscles of the
15 abdominal wall (left inguinal region) were transmurally invaded by a neoplastic white mass.
16 The abdominal skeletal muscles were invaded by nodules from the prepuce skin. Histological
17 evaluations of the skin nodules (Figure 5), internal iliac lymph nodes, and abdominal skeletal
18 muscles revealed metastases of the testicular ICT, as previously identified in the left testicle.
19 Immunohistochemistry was performed using calretinin1, vimentin1, cytokeratin1, placental
20 alkaline phosphatase2 (PLAP), and octamer-binding transcription factor (OCT-3/4)3 in the
21 sections of the primary tumor and of metastasis in the skin. Positive immunostaining was
22 observed only for vimentin (Figure 6). In addition, IHC for CD31 (T lymphocyte), CD791 (B
23 lymphocyte), and MAC-3871 (histiocytic–myelocytic marker) was performed only in the skin
24 sections to rule out other cutaneous round cell tumors. Toluidin blue staining was also
25 performed to rule out mast cell tumor.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

DISCUSSION

The histopathological findings associated with the IHC results observed in the present case were helpful in establishing the diagnosis of malignant ICT. Regarding the histological evaluations, although most neoplastic cells exhibited appearances that are characteristic of Leydig cells, several features indicative of malignancy were also observed. In dogs, malignant ICTs are rare, and multiple organ metastases have been described [2,3,10,19]. Similar to the findings of Laufer & Sulman [10], the dog in the present report was cryptorchid. Moreover, the dog's left testicle was contained in the inguinal region. Cryptorchid testes are most commonly associated with the development of seminomas and SCTs [7]. However, epidemiological studies have reported the occurrence of ICTs in dogs with cryptorchidism [6,11].

Approximately 10%-20% of men present with ICT metastasis [16], and the metastatic varieties are described in adults and elderly individuals aged 29-82 years. Invasive vascular and adnexal testicular structures as well as necrosis, nuclear atypia, and high mitotic index are microscopic findings indicative of malignancy in ICTs in humans [8,16]. The actual differences between benign and malignant ICTs are not well documented in the veterinary literature [3]. In extremely rare cases of malignant ICTs described in dogs, metastases were the main criterion indicative of malignancy [2,10,19].

Malignant ICT in a dog that metastasized to the skeletal musculature of the left pelvic limb has been described [19]. Similar findings were observed in the present case in which invasion of the abdominal wall musculature in the left inguinal region was observed. Recently, malignant ICT with metastasis in the skin of the dorsum and in the interscapular region was observed in a dog [2]. In the present report, cutaneous metastases were also observed on the face, thoracic limbs, and foreskin. Cutaneous metastases of malignant testicular tumors are most commonly observed in seminomas [17,18].

1 In this case report, metastasis to the regional lymph nodes was observed. Metastasis to the
2 internal iliac lymph nodes and the involvement of skeletal muscles adjacent to the region of the
3 primary tumor can be explained by lymphatic spreading and direct tumor extension,
4 respectively. Cutaneous metastases arising from the regions adjacent to the primary tumor site
5 are indicative of lymphatic spreading. However, multiple metastases to various distant skin
6 sites cannot be explained by this mechanism [4]. In the present case, the exact mechanism by
7 which spreading occurred in the skin cannot be determined because of the tumor cells were not
8 identified in the blood vessels of the examined skin sections.

9 Among the examined IHC markers (calretinin, vimentin, cytokeratin, PLAP, and OCT-3/4),
10 only vimentin staining produced a positive result. In one study, the antibody against vimentin
11 stained both normal Sertoli and Leydig cells and tumors arising from these cells, but not
12 seminomas [14], which is an important differential diagnosis in the case described in the
13 present study. Recently, calretinin (along with inhibin-alpha) was utilized to confirm the
14 Leydig cells originating from a malignant metastatic ICT, with weak to moderate
15 immunostaining [2]. However, in another study, in normal canine testis, calretinin expression
16 was restricted to Leydig and Sertoli cells of the testis, and in tumor tissues, calretinin
17 expression was detected in all tumors that were investigated (ICTs, seminoma, and SCTs) [15],
18 indicating the apparent low specificity of this marker for testicular tumors.

19 Some IHC panels have been indicated for the diagnoses of testicular tumors in dogs [13].
20 However, to date, there are no consistent specific IHC markers for canine ICTs [13], indicating
21 that further studies must be conducted in this field. It is important to emphasize that the
22 histomorphology strongly indicated that the tumor cells had interstitial cell characteristics in
23 the present case [12].

24 The negative immunoreactivity for PLAP allowed to rule out seminoma in the differential
25 diagnosis of the primary tumor (corroborating with the result for vimentin, as previously

1 discussed). The skin sections (distant metastases) were negative for T and B lymphocytes and
2 macrophages, thereby ruling out possible differential diagnoses, such as lymphomas or
3 histiocytic tumors, among the cutaneous neoplasms. In this regard, the cellular morphology and
4 negativity in toluidine blue staining also helped in ruling out mast cell tumor. Therefore, this
5 case report described a malignant testicular ICT with an uncommon disseminated pattern of
6 metastases to the skin in a dog.

7

8 MANUFACTURERS

9 ¹DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

10 ²NeoMarkers. Fremont, CA, USA.

11 ³Santa Cruz Biotechnology. Dallas, TX, USA.

12

13 ***Acknowledgements.*** The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de
14 Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support and Enago (www.enago.com) for
15 the English language review.

16

17 ***Declaration of interest.*** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are
18 responsible for the content and writing of the paper.

19

20

REFERENCES

21 **1 Al-Agha O.M. & Axiotis C.A. 2007.** An in-depth look at leydig cell tumor of the testis.

22 *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 131(2): 311-317.

23 **2 Canadas A., Romão P. & Gartner F. 2016.** Multiple cutaneous metastasis of a malignant

24 leydig cell tumour in a dog. *Journal of Comparative Pathology.* 155(2-3): 181-184.

- 1 **3 Dow C. 1962.** Testicular tumours in the dog. *Journal of Comparative Pathology and*
2 *Therapeutics.* 72: 247-265.
- 3 **4 Gates O. 1937.** Cutaneous metastases of malignant disease. *American Journal of Cancer.* 30:
4 718.
- 5 **5 Grem J.L., Robins H.I., Wilson K.S., Gilchrist K. & Trump D.L. 1986.** Metastatic leydig
6 cell tumor of the testis report of three cases and review of the literature. *Cancer.* 58(9): 2116-
7 2119.
- 8 **6 Hayes H.M., Wilson G.P., Pendergrass T.W. & Cox V.S. 1985.** Canine cryptorchism and
9 subsequent testicular neoplasia: case-control study with epidemiologic update. *Teratology.*
10 32(1): 51-56.
- 11 **7 Hayes H.M. & Pendergrass T.W. 1976.** Canine testicular tumors: epidemiologic features of
12 410 dogs. *International Journal of Cancer.* 18(4): 482-487.
- 13 **8 Kim I., Young R.H. & Scully R.E. 1985.** Leydig cell tumors of the testis: a
14 clinicalpathological analysis of 40 cases and review of the literature. *The American Journal of*
15 *Surgical Pathology.* 9 (3): 177-192.
- 16 **9 Kennedy P.C., Cullen J.M., Edwards J.F., Goldschmidt M.H., Larsen S., Munson L. &**
17 **Nielsen S. 1998.** *Histological Classification of Tumors of the Genital System of Domestic*
18 *Animals.* Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, pp.15-24.
- 19 **10 Laufer A. & Sulman F.G. 1956.** Estrogenic Leydig-cell tumor with multiple metastases in
20 a dog; the problem of bisexual hormone production by gonadal cells. *Journal of Clinical*
21 *Endocrinology & Metabolism.* 16(9): 1151-1162.
- 22 **11 Liao A.T., Chu P.Y., Yeh L.S., Lin C.T. & Liu C.H. 2009.** A 12-year retrospective study
23 of canine testicular tumors. *Journal of Veterinary Medical Science.* 71(7): 919-923.
- 24 **12 MacLanchlan N.J. & Kennedy P.C. 2002.** Tumors of the genital system. In: Meuten D.J.
25 (Ed). *Tumors in Domestic Animals.* 4th edn. Ames: Iowa State Press, pp.547-574.

- 1 **13 Owston M.A. & Ramos-Vara J.A. 2007.** Histologic and immunohistochemical
2 characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor
3 in a dog. *Veterinary Pathology*. 44(6): 936-943.
- 4 **14 Peters M.A., Teerds K.J., van der Gaag I., de Rooij D.G. & van Sluijs F.J. 2001.** Use of
5 antibodies against LH receptor, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and vimentin to characterize
6 different types of testicular tumour in dogs. *Reproduction*. 121(2): 287-296.
- 7 **15 Radi Z.A. & Miller D.L. 2005.** Immunohistochemical expression of calretinin in canine
8 testicular tumours and normal canine testicular tissue. *Research in Veterinary Science*. 79(2):
9 125-129.
- 10 **16 Ro J.Y., Kim K., Shen S.S., Amin M.B. & Ayala A.G. 2013.** Tumors and tumors-like
11 conditions of the male genital tract: testicular neoplasms. In: Fletcher C.D.M. (Ed). *Diagnostic*
12 *Histopathology of Tumors*. 4th edn. Philadelphia: Elsevier, pp.951-1009.
- 13 **17 Spugnini E.P., Bartolazzi A. & Ruslander D. 2000.** Seminoma with cutaneous metastases
14 in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 36(3): 253-256.
- 15 **18 Takiguchi M., Iida T., Kudo T. & Hashimoto A.J. 2001.** Malignant seminoma with
16 systemic metastases in a dog. *Small Animal Practice*. 42(7): 360-362.
- 17 **19 Togni A., Rütten M., Bley C.R. & Hurter K. 2015.** Metastasized Leydig cell tumor in a
18 dog. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*. 157(2): 111-115.
- 19
20
21
22
23
24
25
26

1 **Figure legends**

2 Fig. 1 The left testicular parenchyma was completely replaced by a firm, grayish-to-
3 white neoplastic mass (interstitial cell tumor). The right testicle did not exhibit any gross
4 changes.

5 Fig. 2 Histology of the testicular interstitial cell tumor. The neoplastic cells were round-
6 to-oval or polygonal, with abundant eosinophilic cytoplasm. Some cells exhibited high degrees
7 of atypia and pleomorphism and had large nuclei and granular chromatin. Mitotic figures were
8 frequently observed [H&E; Bar= 20 μ m].

9 Fig. 3 Cutaneous metastasis of the testicular interstitial cell tumor. Two nodules were
10 observed in the thoracic limb, and the largest tumor was ulcerated.

11 Fig. 4 Cutaneous metastasis of the testicular interstitial cell tumor. Two salient nodules
12 on the skin of the lumbar region were observed.

13 Fig. 5. Histology of the cutaneous metastasis of the testicular interstitial cell tumor.
14 Neoplastic cells were observed within collagen fibers [H&E; Bar= 20 μ m].

15 Fig. 6. Neoplastic cells were strongly immunolabelled to vimentin. Streptavidin-biotin-
16 peroxidase method [Bar= 20 μ m].

17

18

19

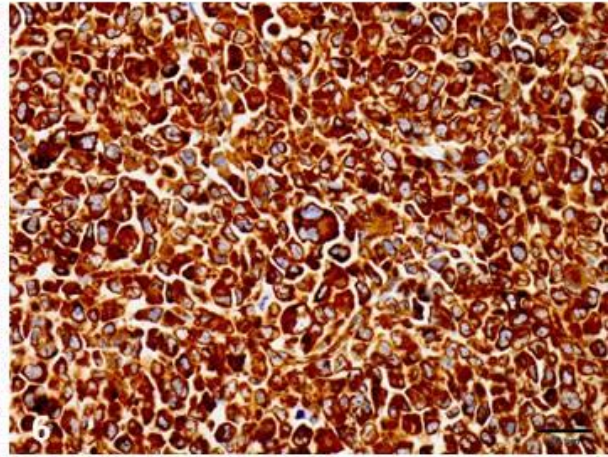
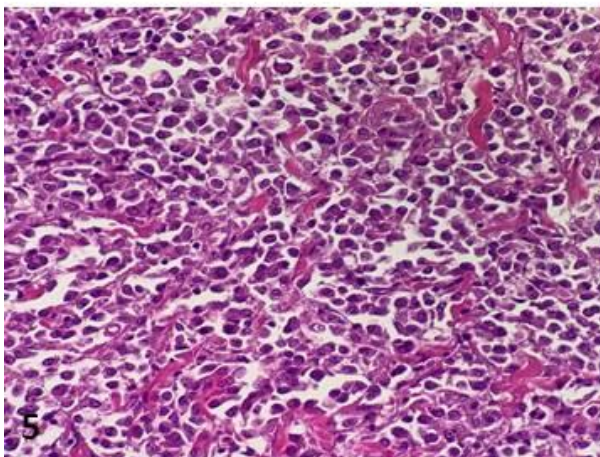
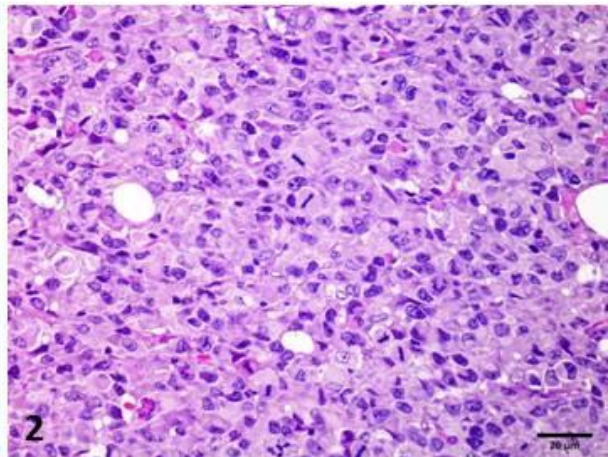
20

21

22

23

1



2

5 DISCUSSÃO

Por meio desta tese foi possível caracterizar as raças/portes, idades, bem como os aspectos clínicos, macroscópicos e histopatológicos dos neoplasmas testiculares em 190 cães, a partir do levantamento das biópsias do LPV-UFSM em um período de 19 anos. Os resultados permitiram a elaboração de dois artigos científicos.

No artigo 1, constatou-se que a prevalência de cães com tumores testiculares entre todos os cães machos acometidos por neoplasmas foi de 11,2%. Resultados semelhantes têm sido observado por outros autores em estudos com amostras de necropsias e/ou espécimes de biópsias (NODTVEDT et al, 2010; SANTOS et al, 2000; SVARA et al, 2014). Considerando os casos disponíveis para reavaliação histopatológica, um total de 220 (10,4%) tumores testiculares foram diagnosticados dentre 2.118 neoplasmas de diferentes localizações que acometeram cães machos. Conforme observado em outros estudos, os seminoma foi o neoplasma mais frequente (SAPIERZYNSKI et al, 2007; SVARA et al, 2014)

Cerca de um quarto dos cães acometidos eram criptorquidas e tinham os testículos neoplásicos em diferentes localizações. Conforme observado por outros autores, seminomas e sertoliomas foram os tumores mais comuns entre os cães criptorquidas (ARGENTA et al, 2016; HAYES et al, 1985). A maioria dos cães com síndromes clínicas características de hiperestrogenismo, foram acometidos unicamente por sertoliomas, ou tiveram esse neoplasma em combinação com outro tipo histológico. Conforme observado em outros estudos, lesões cutâneas e ginecomastia foram achados frequentes (PAEPE et al, 2016; SANPERA et al, 2002; SIEGEL et al, 1967).

Cães unicamente acometidos por seminomas totalizaram 60 casos. O padrão difuso foi o mais frequente, seguido de uma menor proporção de seminomas intratubulares e intratubulares/difusos. Os achados microscópicos observados nos seminomas difusos foram semelhantes aos descritos na literatura (AGNEW; MACLACHLAN, 2017; KENNEDY et al, 1998). Quanto aos seminomas intratubulares, a maioria dos neoplasmas tinham os túbulos seminíferos obliterados por células neoplásicas. No entanto, em alguns dos casos foi possível inferir dois locais de transformações neoplásicas. O ponto mais relevante deste achado, se dá no embate sobre as células de origem dos seminomas caninos. O primeiro estudo abordando essa temática, utilizou de técnica histoquímica com o ácido periódico de Schiff (PAS) e imuno-histoquímica com fosfatase alcalina placentária (PLAP) para identificar a ocorrência em cães das entidades de seminomas clássico e espermatocítico, conforme descrito em

humanos (GRIECO et al, 2007; MOSTOFI, SESTERHENN 2004). Nesse estudo, uma alta proporção dos seminomas tinham aspectos histomorfológicos e imuno-histoquímicos compatíveis com essas entidades, sugerindo que essa mesma classificação pode ser utilizada em cães.

Contudo, em outros estudos também utilizando técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas, os seminomas caninos foram na maior parte dos casos semelhantes aos seminomas espermatocíticos (BUSH et al, 2011; THORVALDSEN et al, (2012). Esses achados são corroborados no presente estudo, no qual, a maior parte dos seminomas intratubulares com evidências iniciais de possíveis transformações neoplásicas tinham as células tumorais localizadas no centro dos túbulos seminíferos e eram periféricamente delimitados por células germinativas e estromais sem transformações neoplásicas. Esse achado faz depreender que os seminomas caninos são originados de células germinativas em estágios mais avançados de maturação. Porém, túbulos seminíferos com células germinativas neoplásicas em justaposição a membrana basal também foram observados. Nesses casos, não foi possível inferir se essas células são originadas de espermatogônias ou de células atípicas equivalentes as células do carcinoma *in situ*.

Os sertoliomas foram os neoplasmas com maior heterogeneidade na morfologia celular. Cinco tipos de arranjos histológicos foram observados. A literatura dispõe de poucos estudos aprofundados sobre a morfológica celular desse neoplasma (COTCHIN, 1960; DOW, 1962), o que inviabilizou comparações entre os tipos de arranjos celular.

O tumor de células intersticiais de Leydig fez o terceiro tipo histológico com maior número de cães afetados. No presente estudo, pode-se perceber que os padrões histológicos preconizados na OMS para classificação dos leydigomas são relevantes, frequentes e de utilidade na rotina diagnóstica (KENNEDY et al, 1998). Ressalta-se a importância de conhecer sobre a variação na morfologia celular desse neoplasma, visto que, em alguns casos, seus aspectos histomorfológicos podem ser bastante semelhantes aos sertoliomas, até mesmo a ponto de serem confundidos (COTCHIN, 1960; DOW, 1962). O TMCGCS é um neoplasma pouco frequente em cães (SVARA et al, 2014). Nos cães deste levantamento, esse neoplasma caracterizou-se por graus variáveis de associação entre células germinativas e de Sertoli neoplásicas, o que os torna verdadeiros desafios diagnósticos.

No artigo 2, foi relatado um caso incomum de tumor de células intersticiais de Leydig (leydigoma) maligno, com múltiplas metástases cutâneas, em um cão da raça Beagle, de 6 anos. Primeiramente foram recebidas para exame histopatológicos amostras de pele e os testículos. O parênquima testicular esquerdo estava completamente obliterado por uma massa,

branco acinzentada, firme, com superfície irregular. Os fragmentos cutâneos estavam espessados e tinham aspecto morfológico semelhante à massa testicular. A massa testicular e os múltiplos nódulos cutâneos foram diagnosticados como leydigoma maligno.

O cão foi submetido à eutanásia um mês após o diagnóstico. Na necropsia, múltiplos nódulos cutâneos foram observados nas regiões de prepúcio, cabeça e membros. Massas em meio ao parênquima do linfonodo ilíaco interno e invasão da musculatura abdominal também foram observadas. Para caracterização imuno-histoquímica (IHQ), foi realizado um painel com oito imunomarcadores [calretinina, vimentina, citoqueratina, fosfatase alcalina placentária (PLAP), fator de transcrição octâmero (OCT-3/4), CD31, CD79 e MAC-3871]. Apenas a vimentina teve imunomarcagem positiva. Os achados de necropsia e histopatológicos associados com a IHQ foram importantes para estabelecer o diagnóstico de leydigoma maligno. Leydigomas malignos em cães são raros. Metástases cutâneas e em múltiplos órgãos são descritas (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016; LAUFER; SULMAN, 1956; TOGNI et al, 2015). Achados semelhantes também foram observados no presente caso, no qual a invasão da musculatura abdominal na região inguinal foi observada. Recentemente, foi relatado um leydigoma maligno com metástases cutâneas nas regiões dorsal e interescapular (CANADAS; ROMÃO; GÄRTNER, 2016). No presente estudo, metástases também foram observadas na face, membros torácicos e prepúcio. Com exceção da vimentina, a negatividade para os outros imunomarcadores, possibilitou descartar outros possíveis diagnósticos diferenciais, tais como seminomas, linfomas e tumores histiocíticos.

6 CONCLUSÕES

- O presente estudo possibilitou determinar a prevalência dos cães acometidos por neoplasmas testiculares na área de abrangência do LPV-UFSM durante um período de 19 anos, bem como caracterizar suas raças, portes raciais e idades. O seminoma foi o neoplasma mais frequente na rotina diagnóstica, seguido de proporções aproximadas entre leydigomas e sertoliomas.

- Aumento de volume testicular foi a manifestação clínica mais comum. As síndromes clínicas de hiperestrogenismo foram mais comuns nos cães acometidos por sertoliomas. Cerca de um quarto dos cães deste levantamento eram criptorquidas; seminomas e sertoliomas foram os neoplasmas mais comuns nos cães criptorquidas.

- A partir da observação dos possíveis locais de transformação das células germinativas neoplásicas, foi possível inferir que a patogênese dos seminomas caninos é mais semelhante à observada nos seminomas espermatocíticos humanos.

- Sertoliomas e leydigomas são neoplasmas com alta variação na morfologia celular. Ressalta-se a importância de conhecer suas variações histomorfológicas, principalmente nos casos com arranjos histológicos semelhantes a esses dois tumores.

- O TMCGCS é pouco frequente em cães, sendo sua morfologia de difícil diagnóstico e caracterizada por graus variáveis de associação entre células germinativas e de Sertoli neoplásicas.

- Tumores de células intersticiais de Leydig malignos (leydigomas malignos) são raros, tendo sido observado somente um caso neste levantamento, com múltiplas metástases cutâneas.

REFERÊNCIAS

ABLE, M. E.; LEE J. C. Ultrastructure of a sertoli cell adenoma of the testis. **Cancer**. v. 23, n. 2, p. 481-486, 01 fev. 1969.

AGNEW, D. W.; MACLACHLAN, J. Tumors of the genital systems. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. Cap. 16. p. 689-722.

AL-AGHA, O. M.; AXIOTIS C. A. An in-depth look at leydig cell tumor of the testis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 131, n. 2, p. 311-317, 02 fev. 2007.

ARGENTA, F. F. et al. Neoplasia testicular em cães no Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.44, p. 1-6, 15 nov. 2016.

BAHRAMI, A. M. D. An Overview of Testicular Germ Cell Tumors. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine (APLM)**. v.131 n.8 p. 1267-1280, ago. 2007.

BANCO, B. et al. Immunohistochemical evaluation of the expression of anti-müllerian hormone in mature, mmature and neoplastic canine sertoli cells. **Journal of Comparative Pathology**. v.146, n.1, p. 18-23. 2012.

BOEKELHEIDE, K. E. J. The rate of 2,5-hexanedione intoxication, not total dose, determines the extent of testicular injury and altered microtubule assembly in the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 94, n.1, p.76-83, jun. 1988.

BOSSCHERE, H. DE.; DEPREST, C. Estrogen-induced pancytopenia due to a sertoli cell tumor in a cryptorchid Beauceron. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. v. 79, n. 4, p. 292-296, 2010.

BUSH, J. M. et al. Testicular germ cell tumours in dogs are predominantly of spermatocytic seminoma type and are frequently associated with somatic cell tumours. **International Journal of Andrology**. v. 34, n. 4, p. 288-295, 16 fev. 2011.

CIAPUTA, R. et al. Seminoma, sertolioma, and leydigoma in dogs: clinical and morphological correlations. **Bulletin- Veterinary Institute In Pulawy**. v. 56, n. 3, p. 361-367, 17 jan. 2013.

COTCHIN, E. Testicular neoplasms in dogs. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v. 70, p. 232-248, 1960.

COOK, J.C. et al. Rodent Leydig Cell Tumorigenesis: A Review of the Physiology, Pathology, Mechanisms, and Relevance to Humans. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 29, n.2, p. 169-261, mar. 1999.

COX, V. S. et al. An anatomic and genetic study of canine cryptorchidism. **Teratology**. v. 18, n. 2, p. 233-240, out. 1978.

CREASY, D.M. Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging. **Toxicologic Pathology**. v.25, n.2, p.119-131, 1997.

DEMİRKAN, I. et al. A metastatic seminoma in a dog. **Kocatepe Veterinary Journal**. v. 1, p. 63-76, 2008.

DOW, C. Testicular tumours in the dog. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v. 72, p. 247-265, jul. 1962.

EL-SHAHAT A.E.R. et al. Altered Testicular Morphology and Oxidative Stress Induced by Cadmium in Experimental Rats and Protective Effect of Simultaneous Green Tea Extract. **International Journal of Morphology**. v.27, n.3, p.757-764, 2009.

EMERSON, R. ULBRIGHT, E. TM The use of immunohistochemistry in the differential diagnosis of tumors of the testis and paratestis. **Seminars in Diagnostic Pathology**. v. 22, n. 1, p. 33-50, 28 jan. 2005.

FAN, T. M.; LORIMIER, L. P. Tumors of the male reproductive system. In: WITHROW, S. J.; VAIL, David M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. Elsevier, 2007. Cap. 27. p. 637-648.

FOSTER, R. A. Male genital system in: MAXIE, M. G, **Pathology of Domestic Animals**. 6 ed. Elsevier, 2016. Vol 3. Cap. 5. p.465-508.

GILL, C.W. Prostatic adenocarcinoma with concurrent sertoli cell tumor in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 22, n. 7, p. 230-233, jul. 1981.

GHOSH, D. et al. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. **Drug and Chemical Toxicology**. v.25 n.3, p.281-292, out. 2002.

GREM, J. L. et al. Metastatic leydig cell tumor of the testis report of three cases and review of the literature. **Cancer**. v. 58 n. 9, p. 2116-2119, 01 nov. 1986.

GREENLEE, P. G.; PATNAIK, A. K. Canine ovarian tumors of germ cell origin. **Veterinary Pathology**. v. 22, n. 2, p. 117-122, 01 mar. 1985.

GRIECO, V. et al. Classical and spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. **Journal of Comparative Pathology**. v. 137, n. 1, p.41-46, 11 jul. 2007.

GRIECO, V. et al. Canine testicular tumors: a Study on 232 dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 138, n. 2-3, p. 86-89, 25 fev. 2008.

GRIECO, V. et al. Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. **Journal of Comparative Pathology**. v. 142, n. 2-3, p. 213-217, abr. 2010.

GROOTENHUIS, A. J et al. Inhibin, gonadotrophins and sex steroids in dogs with sertoli cell tumours. **Journal of Endocrinology**. v. 127, n. 2, p. 235-242, nov. 1990.

GULÇUBUK, A. et al. Ovarian teratoma in a dog. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v. 36, p. 573-576, 2012.

HAYES, H. M.; PENDERGRASS, T. W. Canine testicular tumors: epidemiologic features of 410 dogs. **International Journal of cancer**. v. 18, n. 4, p. 482-487, 15 out. 1976.

HAYES, H. M. et al. Canine cryptorchism and subsequent testicular neoplasia: case-control study with epidemiologic update. **Teratology**. v. 32 n. 1, p. 51-56, ago. 1985.

HAYES, H. M. et al. Excess of seminomas observed in Vietnam Service U.S. military working dogs. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 82, n. 12, p. 1042-1046, 20 jun. 1990.

HAYES, H. M.; TARONE, R. E.; CASEY, H. W. A cohort study of the effects of Vietnam service on testicular pathology of U.S. military working dogs. **Military Medicine**. v. 160, n. 5, p. 248-255, 01 mai. 1995.

HEADLEY, S. A. et al. Ovarian teratoma in a bitch. **Veterinary Record**. v. 158, n. 16, p. 565-567, abr. 2006.

HENDERSON, B. E. et al. Risk factors for cancer of the testis in young men. **International Journal of Cancer**. v. 23, n. 5, p. 598-602, 15 mai. 1979.

HOGENESCH, H. et al. Seminoma with metastases in the eyes and the brain in a dog. **Veterinary Pathology**. v. 24, n. 4, p. 278-280, mai. 1987.

HOHSTETER, M. et al. Canine testicular tumors: two types of seminomas can be differentiated by immunohistochemistry. **Bmc Veterinary Research**. v. 169, n. 10, p. 1-9, 6 ago. 2014.

HONG, S. et al. Spontaneous sertoli cell tumor with cryptorchism in a beagle dog. **Laboratory Animal Research**. v. 27, n. 2, p. 177-178, 27 jun. 2011.

ISHIDA, T.; TAGATZ G. E.; OKAGAKI, T. Gonadoblastoma ultrastructural evidence for testicular origin. **Cancer**. v. 37, n. 4, p. 1770-1781, abr. 1976.

IVASKA, J. et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**. v. 313, n. 10, p. 2050-2062, 14 abr. 2007.

JAMES, R. W.; HEYWOOD, R. Age-related variations in the testes and prostate of beagle dogs. **Toxicology**. v. 12, n. 3, p. 273-279, mar./abr. 1979.

JONES, T. D. et al. OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**. v. 28, n. 7, p. 935-940, jul. 2004.

JOSSO, N; PICARD, J-Y. Anti-müllerian hormone. **Physiological Reviews**. v.66, n.4, p. 1038-1090, 01 out. 1986.

KAWAKAMI, E; HORI, T; TSUTSUI, T. Function of contralateral testis after artificial unilateral cryptorchidism in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 61, n. 10, p. 1107–1111, Jun. 1999.

KENNEDY, P. C. et al. Tumors of the testis. In: KENNEDY, P. C. et al. **Histological World Health Organization Classification of Tumours. Classification of Tumors of the Genital System of Domestic Animals**. Armed Forces Institute of Pathology, 1998, Vol 4. p.15-24.

KIM, O; KIM K.S. Seminoma with hyperestrogenemia in a Yorkshire Terrier. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 67, n.1, p. 121-123, jan. 2005.

KIM, J. H. et al. Canine classical seminoma: a specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. **BMC Cancer**. v.10 n.243, p.1-9 mai. 2010.

KRAGGERUD, S. M. et al. Spermatocytic seminoma as compared to classical seminoma: An immunohistochemical and DNA flow cytometric study. **APMIS**. v. 107, n.3, p.297-302, mar. 1999.

KUDO, T. et al. Malignant Leydig cell tumor in dogs: two cases and a review of the literature. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.31, n. 4, p. 557 - 561, jul. 2019.

LAG, M. et al. Species differences in testicular necrosis and DNA damage, distribution and metabolism of 1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP). **Toxicology**. v.58, p.133-144, 1989.

LAITINEN, M. P. E. et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 85, n. 9, p. 3476-3483. Sep. 2000.

LAUFER, A.; SULMAN F.G. Estrogenic Leydig-cell tumor with multiple metastases in a dog; the problem of bisexual hormone production by gonadal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.16, n. 9, p. 1151-1162 1956.

LIAO, A. T. et al. A 12-Year Retrospective study of canine testicular tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**. v. 71, n. 7, p. 919-923, jul. 2009.

LOWSETH, L. A. et al. Age-related changes in the prostate and testes of the Beagle dog. **Veterinary Pathology**. v. 27, n. 5, p. 347-353, set. 1990.

LUCAS, X. et al. Unusual systemic metastases of malignant seminoma in a dog. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47, n. 4, p. 59-61, ago. 2012.

MACLACHLAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the genital system In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Blackwell Publishing, 2002, Cap. 11. p. 547-574

MADEWELL, B. R. Neoplasms in domestic animals: A review of experimental and spontaneous carcinogenesis. **The Yale Journal of Biology and Medicine**. v. 54, n. 2, p. 111-125, mar. 1981.

MAIOLINO, P. et al. Correlation of nuclear morphometric features with animal and human World Health Organization International histological classifications of canine spontaneous seminomas. **Veterinary Pathology**. v. 41, n. 6, p. 608-611, 01 nov. 2004.

MASSAGUÉ, J.; PANDIELLA, A. Membrane-anchored growth factors, **Annual Review of Biochemistry**. v. 62, p. 515-541, jan. 1993.

MCDONALD, R. K. et al. Radiotherapy of metastatic seminoma in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 2, n. 2, p. 103 -107, abr. 1988.

MILLÁN, J. L. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 261, n. 7, p. 3112-3115, 5 mar. 1986.

MISCHKE, R. et al. Blood plasma concentrations of oestradiol-17 β , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. **Research in Veterinary Science**. v. 73, n. 3, p. 267-272, dec. 2002.

MOCH, H. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. **European Urology**. v.70, n.1, p.93-105 jul. 2016.

MOSTOFI, F. K. Testicular tumors. Epidemiologic, etiologic, and pathologic features. **Cancer**. v. 32, n. 5, p. 1186–1201, nov. 1973.

MOSTOFI, F. K; SESTERHENN, I. A. Tumours of the Testis and Paratesticular Tissue. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2004. p. 232-235.

NAGASHIMA, Y. et al. Ovarian and retroperitoneal teratomas in a dog. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 62, n. 7, p. 793-795, jul. 2000.

NASCIMENTO, L.H.H. et al. Testicular Interstitial Cell Tumor with Disseminated Cutaneous Metastasis in a Dog. *Acta Scientiae Veterinariae* v. 47, p. 1-5, out 2019

NIELSEN, S. W; LEIN, D. H. Tumours of the testis. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 50, n. 1-2, p. 71-78, 1974.

NODTVEDT, A. et al. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumours and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 9, n. 1, p. 45-54, 16 ago. 2010.

NORTH, S.; BANKS, T. Tumours of the urogenital tract: Tumours of the male genital tract. In: NORTH, S.; BANKS, T.. **Introduction to Small Animals Oncology**. Elsevier Limited, 2009. Cap. 17. p. 159-160.

OWSTON, M. A.; RAMOS-VARA, J. A. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. **Veterinary Pathology**. v. 44, n. 6, p. 936-943, 01 nov. 2007.

ORTEGA-PACHECO, A. et al. Pathological conditions of the reproductive organs of male stray dogs in the tropics: prevalence, risk factors, morphological findings and testosterone concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 41, n. 5, p. 429-437, out. 2006.

PAEPE, D. et al. Feminization and severe pancytopenia caused by testicular neoplasia in a cryptorchid dog. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. v. 85, n. 4, p. 197-205, 2016.

PATNAIK, A. K.; MOSTOFI F. K. A Clinicopathologic, histologic, and immunohistochemical study of mixed germ cell-stromal tumors of the testis in 16 Dogs. **Veterinary Pathology**. v. 30, n. 3, p. 287-295, 01 mai. 1993.

PETERS, M. A. J. et al. Use of antibodies against LH receptor, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and vimentin to characterize different types of testicular tumour in dogs. **Reproduction**. v. 121, n. 2, p. 287-296, 1 fev. 2001.

PETERS, M. A. J. et al. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system and steroidogenic enzymes in canine testis tumors. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 1, p. 01-08, 14 fev. 2003.

POST, K.; KILBORN, S. H. Canine sertoli cell tumor: medical records search literature review. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 28, n. 7, p. 427-431, jul. 1987.

QUARTUCCIO, M. et al. Sertoli cell tumors associated with feminizing syndrome and spermatic cord torsion in two cryptorchid dogs. **Journal of Veterinary Science**. v. 13, n. 2, p. 207-209, 15 jun. 2012.

RADI, Z. A.; MILLER, D. I. Immunohistochemical expression of calretinin in canine testicular tumours and normal canine testicular tissue. **Research In Veterinary Science**. Tifton, v. 79, n. 2, p. 125-129, 05 fev. 2005.

REINBERG, Y. et al. Carcinoma in situ of the testis. **The Journal of Urology**. v.142, n.2, p.243-247, ago 1989.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical evaluation of GATA-4 in canine testicular tumors. **Veterinary pathology**. v.46, n.5, p. 893-896. mai. 2009.

REIS-FILHO, J. S. et al. Bilateral gonadoblastomas in a dog with mixed gonadal dysgenesis. **Journal of Comparative Pathology**. v. 130, n. 2-3, p. 229-233, mar. 2004.

REIF, J. S. et al. A cohort study of canine testicular neoplasia. **Journal of The American Veterinary Medical Association**. v. 175, n. 7, p. 719-723, 01 out. 1979.

REY, R et al. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.77, n.5, p. 1220–1226, 01 nov. 1993.

REY, R. et al. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli- and granulosa-cell origin in gonadal tumors. **Human Pathology**. v.31, n.10, p. 1202-1208, mai. 2000.

RHEAUME, E. et al. Molecular biology of the 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family. **Endocrine Reviews**. v. 26, n. 4, p. 525-582, 01 jun. 2005.

RO, J. Y. et al. Tumors and Tumors-like conditions of the Male Genital Tract: Testicular Neoplasms. In FLETCHER, Christopher D.M. (Ed). **Diagnostic Histopathology of Tumors**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, pp. 951-1009.

ROSVOLL, R. V.; WOODARD, J. R. Malignant Sertoli cell tumor of the testis. **Cancer**. v. 22, n. 1, p. 08-13, jul. 1968.

SANFORD, S. E.; MILLER R. B.; HOOVER, D. M. A light and electron microscopical study of intranuclear cytoplasmic invagination in interstitial cell tumours of dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 97, n. 9, p. 629-635, nov. 1987.

SANPERA, N. et al. Oestrogen-induced bone marrow aplasia in a dog with a sertoli cell tumour. **Journal of Small Animal Practice**. v. 43, n. 8, p. 365-369, ago. 2002.

SANTOS, R. L. et al. Testicular tumors in dogs: frequency and age distribution. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n. 1, p. 25-26 fev. 2000.

SAPIERZYNSKI, R. et al. Tumors of the urogenital system in dogs and cats. Retrospective review of 138 cases. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 10, n. 2, p. 97-103, jan. 2007.

SATTLER, M.; SALGIA, R. Targeting c-Kit mutations: basic science to novel therapies. **Leukemia Research**. v. 28, n. 1, p. 11-20, mai. 2004.

SHAW, D. P.; ROTH, J. E. Testicular teratocarcinoma in a Horse. **Veterinary Pathology**. v. 23, n. 3, p. 327-328, mai. 1986.

SIEGEL, E. T. et al. An estrogen study in the feminized dog with testicular neoplasia. **Endocrinology**. v. 80, n. 2, p. 272-277, 01 fev. 1967.

SKAKKEBAEK, N. E. et al. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. **International Journal of Andrology**. v.10, n.1, p.19-28, fev. 1987.

SKAKKEBAEK, N. E. et al. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: An environmental connection? **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v. 106, n. 1-6, p. 03-12, jan. 1998.

SPUGNINI, E. P.; BARTOLAZZI, A.; RUSLANDER, D. Seminoma with cutaneous metastases in a dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 36, n. 3, p. 253-256, mai./jun. 2000.

SVARA, T. et al. A retrospective study of canine testicular tumour in Slovenia. **Slovenian Veterinary Research**. v. 51, n. 2, p. 81-88, 2014.

TALERMAN, A. The pathology of gonadal neoplasms composed of germ cells and sex cord stroma derivatives. **Pathology, Research and Practice**. v. 170, n. 1-3, p. 24-38, dec. 1980.

TANIYAMA, H. et al. Immunohistochemical detection of inhibin- α , - β B, and - β A chains and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in canine testicular tumors and normal testes. **Veterinary Pathology**. v. 38, n. 6, p. 661-666, 1 nov. 2001.

TAKIGUCHI, M. et al. Malignant seminoma with systemic metastases in a dog. **Journal of Small Animal Practice**. v. 42, n. 7, p. 360-362, jul. 2001.

TENNANT, B.; KELLY, D. F. Malignant seminoma with gross metastases in dog. **Journal of Small Animal Practice**. v. 33, n. 5, p. 242-246, mai. 1992.

THORVALDSEN, T. E. et al. Morphological and immunohistochemical characterisation of seminomas in Norwegian dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.54, n.1, p. 1-8, 2012.

TOGNI, A. et al. Metastasized leydig cell tumor in a dog. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**. v. 157, n. 2, p. 111-115, fev. 2015.

TURK, J. R; TURK, M. A; GALLINA, A.M. A canine testicular tumor resembling gonadoblastoma. **Veterinary Pathology**. v. 18, n. 2, p. 201-207, mar. 1981.

VALENTE, P. C. L. G. Bone marrow bi-hypoplasia in a dog with a sertoli cell tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 69. n. 1, p. 95-100, jan./fev. 2017.

VEGTER, A. R et al. Persistent mullerian duct syndrome in a miniature schnauzer dog with signs of feminization and a sertoli cell tumour. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, n. 3, p. 447-452, 10 out. 2010.

VIGER, R.S. et al. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. **Development**. v. 125, n. 14, p. 2665-2675. Jul. 1998.

YANG, Z. W. et al. Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of Leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study. **Asian Journal of Andrology**. v.8, n.3, p.289–299 mai. 2006.

YU, C. H, et al. Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. **Journal of Veterinary Science**. v. 10, n. 1, p. 01-07, 31 mar. 2009.

WAKUI, S. et al. Testicular epidermoid cyst and penile squamous cell carcinoma in a dog. **Journal of Comparative Pathology**. v. 29, n. 6, p. 543-545, 01 nov. 1992.