

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NÚCLEO DE CÉLULAS
NEOPLÁSICAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS**

Arthur Perillo Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel

GOIÂNIA

2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Arthur Perillo Rodrigues

Título do trabalho: AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NÚCLEO DE CÉLULAS NEOPLÁ-
SICAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS

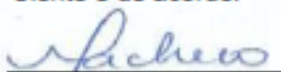
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 27 / 04 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

ARTHUR PERILLO RODRIGUES

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NÚCLEO DE CÉLULAS
NEOPLÁSICAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

Linha de pesquisa:

Patobiologia e Morfofisiologia animal, experimental e comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel – EVZ-UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Danieli Brolo Martins - EVZ-UFG

Profa. Dra. Líliliana Borges de Menezes – IPTSP-UFG

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Perillo Rodrigues, Arthur
AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NÚCLEO DE CÉLULAS
NEOPLÁSICAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS [manuscrito] /
Arthur Perillo Rodrigues. - 2020.
12, 28 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marina Pacheco Miguel; co-orientador
Danieli Brolo Martins; co-orientador Liliane Borges de Menezes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2020.
Bibliografia. Anexos.
Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Câncer de mama. 2. Feulgen. 3. Morfologia nuclear. I. Pacheco
Miguel, Marina, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 547 da sessão de Defesa de Dissertação de Arthur Perillo Rodrigues, que confere o título de Mestre(a) em Ciência Animal, na área de concentração em Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica.

Aos dois dias do mês de março de dois mil e vinte a partir das 09h00min, na sala NUTTs da Faculdade de Medicina da UFG realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "Avaliação morfométrica do núcleo de células neoplásicas mamárias malignas de cadelas". Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Prof.^º Dr.^º Marina Pacheco Miguel (IPTSP/UFV) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof.^º Dr.^º Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo (UFV), membro titular externo; Prof. Dr. Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova-Costa (ACCG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Prof.^º Dr.^º Marina Pacheco Miguel, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos dois dias do mês de março de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, Usuário Externo, em 02/03/2020, às 10:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.339, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Cesar Augusto Sam Tiago Vilanova Costa, Usuário Externo, em 02/03/2020, às 10:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.339, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Marina Pacheco Miguel, Professora do Magistério Superior, em 02/03/2020, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.339, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1186480 e o código CRC 04B61947.

Referência: Processo nº 23070.004551/2020-76

SEI nº 1186480

RESUMO

O estudo da morfologia celular bem como a mensuração nuclear, têm apresentado importância na avaliação histopatológica no câncer de mama em cadelas assim como em mulheres. Haja vista que um dos parâmetros para avaliação do grau de malignidade das neoplasias é o pleomorfismo nuclear. A avaliação da morfometria nuclear pode ser feita com auxílio de *softwares* de bioimagem, facilitando a análise de maiores números de casos, reduzindo a subjetividade entre observadores por apresentarem valores quantitativos, de baixo custo e fácil utilização. Objetivo: realizar morfometria nuclear em neoplasias malignas de mama em cadelas e verificar a aplicabilidade da coloração de Feulgen nesta análise. Material e métodos: para as análises nucleares, fotomicrografias provenientes de lâminas de câncer de mama de cadelas, foram capturadas (aumento 400X), utilizando um microscópio com câmera acoplada (Leica® DMC 2900) e o software ImageJ (NIH Image 1.52d) para obtenção dos parâmetros nucleares: área, perímetro, Feret e circularidade. Resultados: Os carcinomas sólidos apresentaram maior área média ($85.40\mu\text{m}^2 \pm 0.3159$) e perímetro médio ($48.33\mu\text{m}^2 \pm 0.1217$), quando comparados com o carcinoma tubulopapilar e complexo ($P < 0,0001$). Assim, maiores medidas nucleares podem ser associadas a neoplasias malignas de maior grau de malignidade.

Palavras chaves: Câncer de mama, feulgen, morfologia nuclear.

ABSTRACT

The study of cell morphology, as well as nuclear measurement, is important in the histopathological evaluation of breast cancer in female dogs, as well as in women. Bearing in mind that one of the parameters for assessing the degree of malignancy of neoplasms is nuclear pleomorphism. An evaluation of nuclear morphometry can be done with the help of bioimaging software, facilitating the analysis of larger numbers of cases, using subjectivity among observers for quantitative values, low and easy to use. Objective: perform nuclear morphometry in malignant breast neoplasms in female dogs and verify the applicability of Feulgen stain in this analysis. Material and methods: for nuclear analysis, photomicrographs of bitches' breast cancer slides, screen capture (400X magnification), use of a microscope with coupling camera (Leica® DMC 2900) and the ImageJ software (NIH Image 1.52d) to display the nuclear parameters: area, perimeter, Feret and circularity. Results: Carcinomas had the highest mean ($85.40\mu\text{m}^2 \pm 0.3159$) and the average perimeter ($48.33\mu\text{m}^2 \pm 0.1217$), when compared to complex and tubulopapillary carcinoma ($P < 0.0001$). Thus, the largest nuclear measures can be associated with malignant neoplasms with a higher degree of malignancy.

Keywords: Breast cancer, feulgen, nuclear morphology.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, a todos os professores e funcionários.

Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq).

À minha orientadora Profa. Dra. Marina Pacheco Miguel, pessoa que tenho tamanha admiração.

Aos meus pais e irmãos, por estarem sempre ao meu lado.

E a todos aqueles que contribuíram de sua forma na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Neoplasias malignas em cães.....	17
2.2 Avaliação histopatológica de tumores mamários caninos.....	18
2.3 Morfologia nuclear de células cancerosas.....	21
2.4 Parâmetros nucleares mensuráveis.....	24
2.5 Método de Feulgen para avaliação nuclear.....	25
2.6 Bioimagem em patologia.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2 – MEDIDAS MORFOMÉTRICAS NUCLEARES SÃO MAIORES EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS DE MAIOR MALIGNIDADE.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Aspectos éticos e seleção das amostras.....	36
2.3 Técnica de microarranjo tecidual (TMA).....	37
2.4 Morfometria nuclear automatizada.....	38
2.5 Análise estatística.....	40
3. RESULTADOS.....	40
4. DISCUSSÃO.....	43
5. CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....48
ANEXO A.....45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- FIGURA 1: Fotomicrografias carcinomas mamários de cadelas. A) carcinoma tubular, com células dispostas em fileiras de uma ou duas células formando túbulos, evidenciando pleomorfismo nuclear. B) carcinoma tubulopapilar, com células organizadas em túbulos formando papilas, exibindo pleomorfismo nuclear. C) carcinoma sólido, exibindo cordões de células formando folhas ou lóbulos sólidos, núcleos pleomórficos e com pontilhados de cromatina. D) carcinoma complexo, com células desorganizadas sem limites celulares, núcleos pleomórficos com pontilhados de cromatina. Coloração hematoxilina e eosina.....20
- FIGURA 2: Núcleo com morfologia normal e alterada. A) o núcleo normal apresenta-se redondo ou oval, nota-se a membrana nuclear que o separa do citoplasma e adjacente as lâminas nucleares, associada a heterocromatina. Tipicamente apresentam de 1-3 nucléolos que formam rna mensageiros, entre outras proteínas importantes para o controle da proliferação celular. Cordões com proteínas (pretos com círculos em azul) da matriz nuclear auxiliam na sustentação do arcabouço nuclear. Em vermelho, corpos pml (promyelocytic leukaemia) que auxiliam na transcrição gênica. B) núcleo com sua arquitetura desorganizada, presença de agregados de heterocromatina, compartimento perinuclear em rosa ao lado de um único nucléolo aumentado e corpos pml desorganizados e diminuídos de tamanho.....23
- FIGURA 3: Parâmetros de avaliação e mensuração nuclear.....24
- FIGURA 4: Fotomicrografias de mucosa oral coradas com feulgen. A) núcleos corados de mucosa oral normal. B) núcleos de mucosa oral severamente displásica.....26

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – MEDIDAS MORFOMÉTRICAS NUCLEARES SÃO MAIORES EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS DE MAIOR MALIGNIDADE

- FIGURA 1 - Etapas da análise morfométrica utilizando *image j* – fotomicrografia de carcinoma tubular, grau ii, corado com *feulgen* (aumento de 400x). A) aquisição da imagem pelo software com correção de brilho. B) escolha da imagem com o canal de cor verde (função *split chanel*s). C) imagem após ajuste *threshold* e aplicação do processo de separação de partículas (*watershed*). D) partículas a serem mensuradas após função *analyse particles* com intervalo de seleção no tamanho de partículas de 40-170.39
- FIGURA 2 – Fotomicrografia de carcinoma mamário de cadela. Núcleos de células neoplásicas malignas corados em rosa acentuada pela coloração de feulgen. É possível notar a distinção dos núcleos para o restante do tecido que apresenta coloração róseo pálido. Feulgen, 400x.41

LISTA DE QUADROS**CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

QUADRO 1: Comparação de critérios para graduação histológica de malignidade por campo microscópico de neoplasias malignas em cães ^{27 28}	21
--	----

CAPÍTULO 2 – MEDIDAS MORFOMÉTRICAS NUCLEARES SÃO MAIORES EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS DE MAIOR MALIGNIDADE

QUADRO 1 – Parâmetros e pontos para graduação histológica de neoplasia mamária em cadelas ¹	33
--	----

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2 – MEDIDAS MORFOMÉTRICAS NUCLEARES SÃO MAIORES EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS MALIGNAS DE CADELAS DE MAIOR
MALIGNIDADE**

TABELA 1: Média, desvio padrão e valor de p de área nuclear, perímetro nuclear, Feret e circularidade de carcinomas mamários de cadelas.....	45
TABELA 2: Média, desvio padrão e valor de p de área nuclear, perímetro nuclear, Feret e circularidade de carcinomas mamários de cadelas de acordo com o grau de malignidade.....	46

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são de grande importância na medicina e medicina veterinária, compartilhando várias características epidemiológicas, clínicas, bioquímicas e histopatológicas. Apresenta-se como um dos mais comuns diagnósticos em cadelas, com aproximadamente 50-70%^{2,3} destes sendo malignos. Este fato tem contribuído relativamente com o aumento de buscas por tratamento e prognóstico eficazes⁴.

A palavra câncer é utilizada para designar lesões proliferativas, sem controle replicativo e com capacidade de invasão e metástase. O início da lesão ocorre por mutação genética podendo ser de forma espontânea, por característica hereditária ou também provocada por fatores epigenéticos. A atuação prolongada destes agentes provocam alterações genéticas nestas células, o que acarretará em um processo denominado de iniciação da carcinogênese, ocorrendo atuação dos genes oncopromotores a lesão evoluirá para as etapas de promoção e progressão do câncer^{5,6}.

A classificação histomorfológica de tumores mamários de cadelas é feita pela diferenciação morfológica tumoral, características teciduais e celulares de malignidade. Além disso, é recomendado a análise do grau de malignidade quando a neoplasia é maligna. Assim, o patologista deve avaliar a porcentagem de três variáveis: formação de túbulos, grau de pleomorfismo nuclear e a quantidade de células mitóticas. Então, um sistema de pontuação numérica é gerado, e a somatória das pontuações individuais destas variáveis estabelece o grau de diferenciação para cada tumor, que irá do grau I (bem diferenciado), grau II (moderadamente diferenciado) ao grau III (pouco diferenciado)¹. Assim, a avaliação histopatológica de células cancerosas, bem como a morfometria celular/nuclear e a organização do microambiente tumoral, trazem informações importantes com possíveis aplicações diagnósticas e prognósticas na oncologia^{7,8}.

Nas neoplasias malignas, a arquitetura nuclear está frequentemente alterada e em determinadas neoplasias algumas alterações características facilitam o diagnóstico, tais como núcleos com formas irregulares e com agregados grosseiros de heterocromatina⁹. Assim, a morfometria nuclear apresenta-se como um método de avaliação promissor, menos subjetivo e reprodutível para análise da morfologia celular em neoplasias, pois permite obter parâmetros como tamanho, forma, organização da cromatina e quantidade de nucléolos. Desta forma, essa

análise poderá ser utilizada para aprimorar os critérios diagnósticos em patologia, e também ser utilizada para fornecer fatores auxiliares ao prognóstico dos pacientes¹⁰.

Para o estudo nuclear são necessários métodos específicos de coloração do núcleo celular, como a reação de Feulgen, que é um método histoquímico específico ao DNA, o qual foi proposto por Robert Feulgen e Heinrich Rossenbeck. Esta coloração consiste primeiramente na desnaturação do DNA por hidrólise ácida, que induz a depurinação de nucleotídeos com posterior exposição dos mesmos, funcionando como aldeídos. A segunda etapa do teste permite a reação do tecido com reagente de Schiff, reagindo com os grupos aldeídos, resultando em um produto de cor magenta. Desta forma, verifica-se à microscopia a organização nuclear que permite análises qualitativas e quantitativas para avaliação do DNA em células animais e vegetais. Além disso, com essa reação é possível estudar a organização da cromatina nuclear induzida por morte celular, discriminando regiões correspondentes aos domínios de heterocromatina e eucromatina¹¹. O contraste nuclear obtido com a reação de Feulgen possibilita a utilização de ferramentas automatizadas por meio de softwares, reduzindo a subjetividade nas análises, sendo superior no estudo nuclear, em comparação com outras colorações.

A graduação de malignidade de neoplasias é amplamente utilizada no diagnóstico histopatológico das lesões, prognóstico e tratamento dos pacientes¹². No entanto, apresenta algumas desvantagens, como a alta subjetividade e dissenso existente entre patologistas, correspondendo com baixa reprodutibilidade. No anseio de reduzir a subjetividade e aumentar a reprodutibilidade dos estudos das neoplasias mamárias caninas, o objetivo desse trabalho foi avaliar a aplicabilidade da reação de Feulgen e realizar a análise das características morfométricas nucleares, com o auxílio de ferramenta automatizada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias malignas em cães

O câncer é uma doença multifatorial que tem seu início a partir de mutações ou alterações genéticas e por influência de diversos fatores epigenéticos. As alterações genéticas podem ser deleções de genes, aumento de expressão gênica, mutação em proto-oncogenes ou de genes supressores de tumor, que podem levar à transformação de uma célula normal em uma célula maligna. Além disso, ocorre interação das células tumorais com componentes do estroma circundante, o que pode contribuir para manutenção e progressão do tumor. A célula neoplásica possui como principal característica a proliferação descontrolada, a qual é sustentada por oncopromotores, pelo recrutamento de células imunológicas e incentivo à angiogênese, os quais são os principais fatores promotores de crescimento e sobrevivência tumoral¹³⁻¹⁵.

As neoplasias são compostas por dois elementos básicos: o parênquima e estroma tumoral. O parênquima é constituído por células neoplásicas, de origem epitelial ou mesenquimal. O estroma consiste em fibroblastos associados ao câncer, células endoteliais, adipócitos e células imuno-reguladoras¹⁶, o qual é uma extensão do tecido normal adjacente estimulado a proliferar e crescer pela ação de fatores secretados pelas células neoplásicas¹⁷.

Não obstante, as células tumorais apresentam pleomorfismo nuclear, configurações atípicas de cromatina e muitas vezes núcleos aumentados. Algumas destas características são importantes na progressão tumoral, como a adesão e a motilidade celular que são cruciais no processo de metástase. Para isso, a plasticidade da forma nuclear e também das células, permite alterações necessárias para que estas consigam proliferar e trafegar por espaços restritos até formarem um novo nicho tumoral¹⁸.

As neoplasias mamárias são de grande importância na medicina e medicina veterinária, compartilhando várias características epidemiológicas, clínico-patológicas e bioquímicas, apresentando como o tumor mais comumente diagnosticado em cadelas³. Dentre as neoplasias que acometem mulheres e animais domésticos, o câncer de mama é uma doença com alta mortalidade de mulheres no mundo^{19, 20}, e de alta incidência em cadelas, onde aproximadamente 200 cadelas são acometidas a cada 100 mil cães^{21, 22}. Há relatos de que cães de raça pura apresentam maior probabilidade de desenvolverem neoplasias malignas em comparação com aqueles de raças mestiças. Além disso, os diagnósticos de câncer mamário

canino mais frequentes são carcinoma tubular (adenocarcinoma), seguido de carcinoma papilar, carcinoma sólido, carcinoma complexo e carcinosarcoma^{2, 23, 24}.

2.2 Avaliação histopatológica de tumores mamários caninos

A avaliação histopatológica dos tumores é uma ferramenta de grande importância para o diagnóstico e prognóstico do paciente oncológico, avaliando a arquitetura e a morfologia da lesão. Esta permite aos patologistas achados sobre a lesão, como infiltração na pele, nos tecidos moles e de vasos sanguíneos. Além disso, pode ser avaliada a presença ou ausência de pleomorfismo celular, grau de diferenciação celular, índice mitótico, presença ou ausência de necrose e avaliação da camada de células basais e mioepiteliais¹².

Um dos tipos de neoplasia mamária maligna mais diagnosticada é o carcinoma simples, o qual é composto por um tipo celular, lembrando células epiteliais lúminais ou células mioepiteliais^{25, 26}. Neste tipo, o subtipo carcinoma tubular e o tubulopapilar (figura 1) apresentam células predominantemente dispostas de maneira tubular, com variáveis na morfologia e dispostas em sequências de 1 a 2 células. Os núcleos podem ser hipocrômicos, normocrômicos ou hiperocrômicos, o nucléolo pode ser único e relativamente grande ou múltiplo e pequeno. A formação dos túbulos, a morfologia celular e a taxa mitótica são as características que formam a base para a classificação deste tipo. Quando considerado tubulopapilar apresenta os túbulos predominantemente dispostos de maneira papilar ou pedunculada. Com características bem semelhantes quanto a morfologia nuclear, se diferencia do tipo tubular por apresentar papilas que se estendem para a luz tubular. Estas papilas são sustentadas por um estroma fibroso de tecido conjuntivo²⁶. Além disso, o estroma intertubular consiste em vasos e fibroblastos, e pode haver infiltrado por plasmócitos, linfócitos e macrófagos^{12, 26}.

O carcinoma de tipo complexo é caracterizado pela presença de duas populações celulares diferentes, um componente epitelial maligno e um componente mioepitelial benigno, as quais são sustentadas por um estroma fibrovascular. A população de células epiteliais é organizada em túbulos irregulares alinhados em uma única ou em várias camadas, com uma quantidade escassa a moderada de citoplasma eosinofílico. Essas células exibem anisocariose e anisocitose moderada a acentuada e números variáveis de mitoses. A necrose dessas células epiteliais pode ser focal ou multifocal, focos ocasionais de diferenciação escamosa podem estar presentes. A segunda população é composta por células mioepiteliais dispostas em feixes irregulares dentro de uma membrana basofílica fibrilar. Essas células são desorganizadas e

não apresentam limites celulares, citoplasma levemente eosinofílico com núcleos centrais que variam de formatos redondos a ovoides com cromatina pontilhada e um pequeno nucléolo central. Na periferia da neoplasia, pode haver focos inflamatórios consistindo principalmente de linfócitos e plasmócitos²⁶.

O carcinoma sólido apresenta-se com células predominantemente dispostas em folhas sólidas, cordões ou massas. É composto de células intimamente compactadas para formar lóbulos densos de tamanho irregular, apoiados por um estroma fibrovascular fino. Suas células são poligonais ou ovais, e muitas vezes têm margens mal demarcadas e citoplasma escasso. Seus núcleos são ovais e frequentemente hiper cromáticos, com cromatina grosseiramente pontilhada e um único nucléolo basófilo central²⁵. Já o carcinosarcoma trata-se de uma neoplasia incomum da glândula mamária²⁶, contendo áreas carcinomatosas e sarcomatosas. Sua porção epitelial pode apresentar células luminiais e/ou mioepiteliais, com padrões sólido, escamoso, mucinoso e anaplásico. Seu componente mesenquimal pode apresentar áreas fibromatosas, condromatosas e osteomatosas²⁵.

Os critérios significativos para o diagnóstico histopatológico das neoplasias mamárias em cães, com base em avaliações histológicas em hematoxilina e eosina, são o tipo de tumor, pleomorfismo nuclear e celular significativo, índice mitótico, presença de áreas de necrose distribuídas aleatoriamente dentro da neoplasia, invasão peritumoral e linfática, e metástase linfonodal regional²⁶. Além da avaliação para diagnóstico histopatológico, é fundamental a graduação histológica de malignidade nas neoplasias malignas (quadro 1), a fim de contribuir para o prognóstico e tratamento dos pacientes. Em 2011^{12, 26} foi realizada uma atualização da classificação histológica para neoplasias mamárias epiteliais malignas em cadelas, a fim de melhorar a padronização diagnóstica.

Vale ressaltar a importância do estudo das características citológicas, bem como o estudo nuclear. A avaliação qualitativa nuclear das células neoplásicas mamárias de cães já está bem definida^{12, 26}, já os padrões quantitativos que possibilitam a mensuração não estão completamente estabelecidos e carecem de mais estudos para demonstrar as possíveis contribuições para o diagnóstico microscópico de neoplasias.

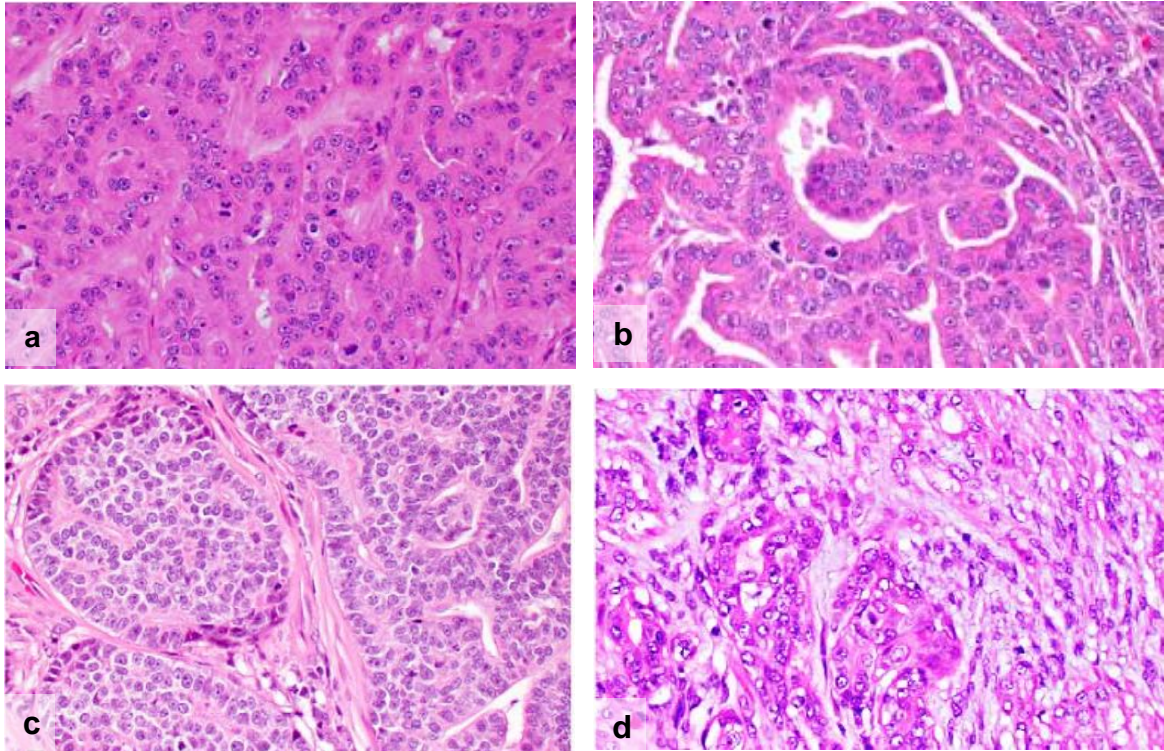


FIGURA 1: Fotomicrografias carcinomas mamários de cadelas. a) Carcinoma tubular, com células dispostas em fileiras de uma ou duas células formando túbulos, evidenciando pleomorfismo nuclear. b) Carcinoma tubulopapilar, com células organizadas em túbulos formando papilas, exibindo pleomorfismo nuclear. c) Carcinoma sólido, exibindo cordões de células formando folhas ou lóbulos sólidos, núcleos pleomórficos e com pontilhados de cromatina. d) Carcinoma complexo, com células desorganizadas sem limites celulares, núcleos pleomórficos com pontilhados de cromatina. Coloração Hematoxilina e Eosina. Fonte: Adaptado de Goldschmidt, 2011²⁶.

QUADRO 1: Comparação de critérios para graduação histológica de malignidade por campo microscópico de neoplasias malignas em cães descritos por Peña²⁷ e Misdorp^{27, 28}.

Autores	Grau	Formação tubular	Pleomorfismo nuclear	Nº de mitoses por campo/ cromatina desorganizada
<i>Peña</i>	1	Formação tubular (> 75% para cada espécie)	Núcleos pequenos, uniformes e ocasionalmente evidência de nucléolos	0-9 mitoses 10 células com cromatina desorganizada
<i>Misdorp</i>		Formação tubular bem delimitada	Poucos pleomorfismo nuclear	Ocasionalmente figuras mitóticas e células com cromatina desorganizada
<i>Peña</i>	2	Moderada formação tubular (10- 75%, média por espécime)	Grau moderado de variação nuclear (tamanho, forma e cromatina desorganizada)	10-19 mitoses Aproximadamente 10 células com cromatina desorganizada
<i>Misdorp</i>		Formação tubular moderada	Pleomorfismo nuclear moderado	2-3 figuras de mitoses e células com cromatina desorganizada
<i>Peña</i>	3	Formação tubular reduzida (<10% para cada espécime)	Variação nuclear evidente, evidência de cromatina desorganizada e nucléolos	>20 mitoses Aproximadamente 10 células com cromatina desorganizada
<i>Misdorp</i>		Pouca ou nenhuma formação tubular	Evidente pleomorfismo nuclear	2-3 figuras de mitoses e células com cromatina desorganizada

Fonte: Adaptado de Goldschmidt, 2011²⁶.

2.3 Morfologia nuclear de células cancerosas

A morfologia nuclear no câncer tem apresentado destaque desde as primeiras observações das alterações nucleares em 1860 por Lionel Beale, quando analisou-se um expectorado de um paciente com câncer de faringe. Aproximadamente meio século após, George Papanicolaou desenvolveu uma coloração que auxilia na análise de várias características celulares, tanto citoplasmáticas quanto nucleares, de grande impacto no diagnóstico do câncer de colo de útero em mulheres sendo fortemente empregada até os dias atuais²⁹.

Um conhecimento profundo sobre a organização nuclear no câncer pode auxiliar na patologia, no diagnóstico e prognóstico. O núcleo celular normalmente apresenta uma forma oval ou redonda e possui funções primordiais como regular o metabolismo celular e armazenar o material genético (DNA). Possui um envelope que separa os cromossomos do citoplasma celular. É dividido estruturalmente em duas regiões³⁰, o envelope nuclear e o

interior nuclear. O envelope nuclear consiste em duas membranas de bicamada fosfolipídica (membrana nuclear externa perfurada por complexos de poros nucleares, que é contínua com o retículo endoplasmático e a membrana nuclear interna) e a lâmina nuclear (constituída principalmente por lâminas do tipo A e do tipo B). Em muitas doenças, as alterações na forma nuclear são devidas alterações na lâmina nuclear e ou por forças que agem no citoplasma celular^{31, 32}.

Dentro do núcleo, os cromossomos são organizados em territórios cromossômicos, regiões cromossômicas heterocromáticas, que são domínios cromossômicos transcricionalmente inativos, que tendem a localizar na periferia nuclear (figura 2). Uma das principais estruturas constituintes nucleares é a matriz, a qual auxilia na organização dos arranjos nucleares complexos por ligações da lâmina nuclear²⁸. A matriz nuclear participa espacialmente na organização do DNA que é enrolado em histonas no núcleo em interfase. Estruturas nucleares como nucléolos, corpos de Cajal e corpos de PML (*promyelocytic leukaemia*) também estão presentes como elementos estruturais e funcionais distintos^{30, 31}.

Como descrito na literatura³³, há três hipóteses para os movimentos dos cromossomos e organização da cromatina no núcleo, conforme Theodor Boveri (1909). A primeira é que os arranjos cromossômicos são mantidos durante a interfase. A segunda hipótese prediz que a estabilidade organizacional cromossômica se perde durante a prometáfase, como consequência os cromossomos se movimentam mais. E por último, mesmo que os núcleos da célula ‘mãe’ e ‘filha’ não compartilham padrões semelhantes, os núcleos das células filhas compartilhariam entre si padrões semelhantes de organização.

A morfologia nuclear é frequentemente alterada nas células cancerosas. Tipos específicos de tumores estão associados a alterações específicas que representam uma importante característica diagnóstica^{12, 25, 26}. Diferentemente dos núcleos normais, os núcleos de células cancerosas variam de tamanho, podem apresentar-se aumentados e dobrados, evidenciando o pleomorfismo nuclear. Os núcleos apresentam também alterações nos padrões da cromatina, como agregados grosseiros da mesma e anormalidades nucleolares, sendo comum também observar o compartimento perinuclear^{9, 34}. A dinâmica na migração e adesão celular no câncer é importante no processo de metástase, onde as células cancerosas escapam do tumor primário, e entram na vasculatura e extravasam para invadir um novo nicho. Uma mudança em qualquer elemento estrutural do núcleo tem o potencial de afetar a migração celular, aumentando a plasticidade da forma nuclear e permitindo alterações na forma da célula necessárias para se comprimir por espaços restritos³⁵.

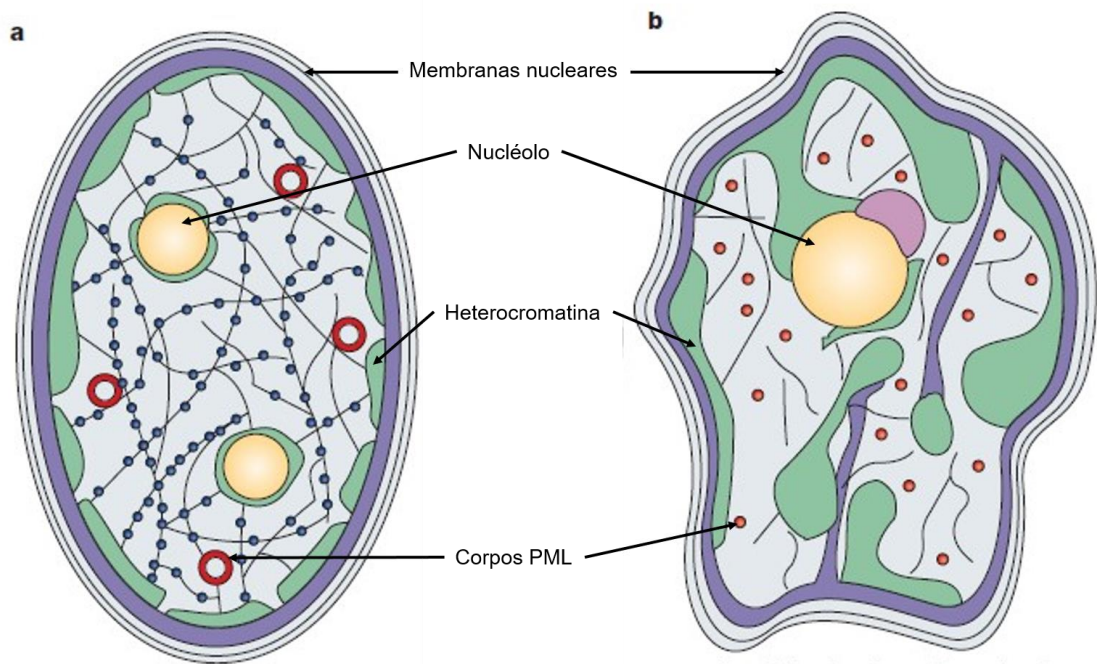


FIGURA 2: Núcleo com morfologia normal e alterada. a) O núcleo normal apresenta-se redondo ou oval, nota-se a membrana nuclear que o separa do citoplasma e adjacente as lâminas nucleares, associada a heterocromatina. Tipicamente apresentam de 1-3 nucléolos que formam RNA mensageiros, entre outras proteínas importantes para o controle da proliferação celular. Cordões com proteínas (pretos com círculos em azul) da matriz nuclear auxiliam na sustentação do arcabouço nuclear. Em vermelho, corpos PML (*promyelocytic leukaemia*) que auxiliam na transcrição gênica. b) Núcleo com sua arquitetura desorganizada, presença de agregados de heterocromatina, compartimento perinuclear em rosa ao lado de um único nucléolo aumentado e corpos PML desorganizados e diminuídos de tamanho. Fonte: Adaptado de Zink, 2004.

As alterações morfológicas específicas apresentadas pelo núcleo são utilizadas frequentemente por patologistas para classificar e especificar o tipo e o estágio do câncer. Isto deve-se ao fato de a desregulação do genoma e as perturbações na arquitetura nuclear, tão evidentemente exibidas no câncer estarem fortemente relacionadas com a agressividade tumoral. Características como tamanho e forma do núcleo são determinados pelos componentes dinâmicos da matriz nuclear e pela interação da cromatina com DNA nas células eucarióticas. Acredita-se que a perturbação da cromatina e as assinaturas epigenéticas podem levar a alterações na estrutura nuclear e que essas perturbações podem ser o cerne da gênese do câncer²⁹.

2.4 Parâmetros nucleares mensuráveis

As primeiras observações nucleares da localização de DNA foram feitas por André Boivin e Roger Colette Vendrely em núcleos de bactérias em 1948. Com o passar dos anos, as metodologias de avaliação nuclear foram se tornando mais objetivas e embasadas em análises morfométricas. Desta forma, a morfometria apresenta aplicabilidade reduzindo a subjetividade e por permitir maior reprodutibilidade entre observadores diferentes⁷, tornando possível mensurar de maneira automatizada os parâmetros nucleares em pixel e cada pixel pode ser convertido a micrômetro específico para cada aumento microscópico^{7, 8, 36}. Na figura 3 são apresentados os principais parâmetros determinados por morfometria em relação à avaliação nuclear.



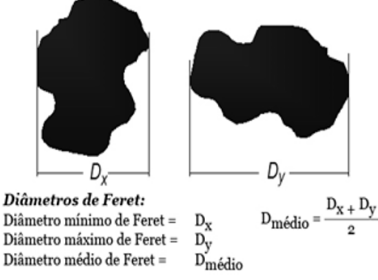
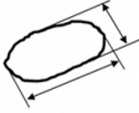
	<p>Área</p> <p>Medida da área dentro do polígono definido pelo perímetro</p>
	<p>Perímetro</p> <p>Comprimento do limite externo calculado a partir do centro do polígono</p>
 <p>Diâmetros de Feret: Diâmetro mínimo de Feret = D_x Diâmetro máximo de Feret = D_y Diâmetro médio de Feret = $D_{médio}$</p> <p>$D_{médio} = \frac{D_x + D_y}{2}$</p>	<p>Feret</p> <p>Maior distância entre dois pontos no limite de seleção</p> <p>Feret X</p> <p>Medida da paralela vertical da partícula</p> <p>Feret Y</p> <p>Medida da linha paralela horizontal da partícula</p>
 <p>$(4 * \pi * \text{Área} / \text{Perímetro}^2)$</p>	<p>Circularidade</p> <p>Calculado usando o perímetro de borda</p> <p>Valor = 1,0 indica um círculo perfeito</p>

FIGURA 3: Parâmetros de avaliação e mensuração nuclear.

Fonte: Adaptado de Di Donato³⁷

Em um estudo de morfometria nuclear, observou-se³⁴ que células epiteliais pulmonares neoplásicas apresentaram área nuclear significativamente maior quando comparadas com as células sem evidências de malignidade. Outro estudo similar realizado

com células mamárias, demonstrou que a área nuclear das células de lesões malignas apresentaram-se maior que a área das células de lesões benignas³⁸. Ambos estudos foram feitos com biópsias de neoplasias humanas. Simeonov e Simeonova³⁹, relataram que os parâmetros de diâmetro nuclear médio e circularidade podem ser utilizados na diferenciação pré-operatória de tumores benignos de malignos. O estudo evidenciou que a mensuração quantitativa nuclear é promissora, objetiva e reprodutível.

2.5 Método de Feulgen para avaliação nuclear

O método de Feulgen foi descrito por Robert Feulgen e Heinrich Rossenbeck para determinação de DNA em amostras histológicas e citológicas há mais de um século^{11, 40}. A avaliação nuclear por imagem é rotineiramente aplicada tanto para o diagnóstico quanto prognóstico no câncer e, para isso, a reprodutibilidade da avaliação deve ser confiável. O protocolo do método é modificado frequentemente, porém os componentes básicos não são alterados⁴¹⁻⁴³.

A coloração fundamenta-se na reação do reagente de *Schiff*, que é uma solução de cloreto de pararosanilina (vermelho-púrpura colorido). Esta solução reage com grupos aldeídos das moléculas de desoxirribose após hidrólise com HCl e gera grupos de aldeídos livres na molécula de DNA (separando as bases púricas, Adenina e Guanina). Após este processo, faz-se a coloração com o reagente de *Schiff* e, então, observa-se a recuperação das células com a cor rosa gerada pela fucsina (figura 4)⁴³.

O método de Feulgen tem servido para diversos objetivos, em estudos biológicos básicos e nas ciências biomédicas relativas à localização, quantificação e distribuição de DNA em uma variedade de células normais e anormais⁴⁰. Com essa metodologia foi possível identificar a relação entre o DNA no conteúdo de um núcleo celular com número cromossômico⁴⁴. Além disso, pode-se verificar que antes da mitose na interfase, as células dobram o seu conteúdo⁴⁵ nas fases G1 (síntese de RNA e proteínas), S (replicação do DNA) e G2 (síntese de proteínas de polimerização microtubular).

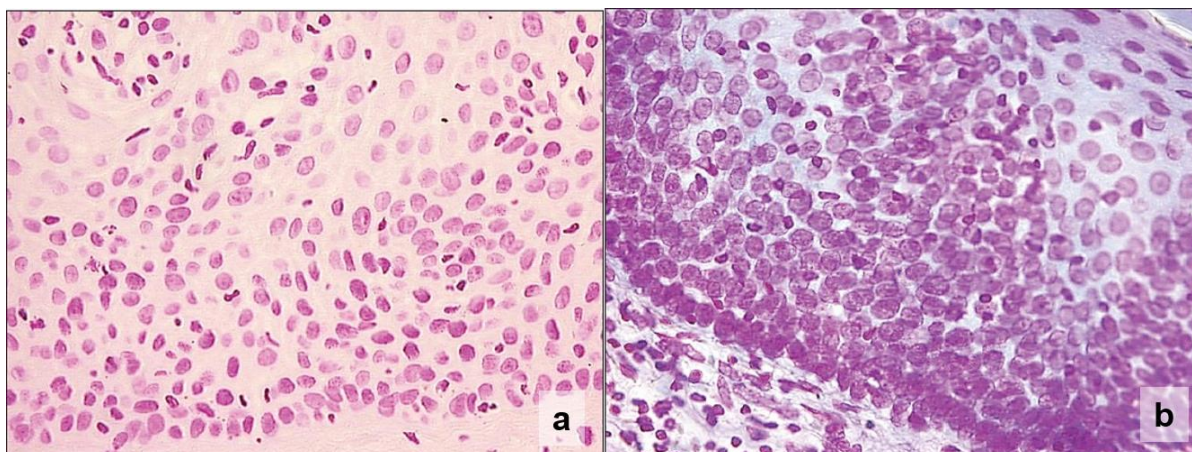


FIGURA 4: Fotomicrografias de mucosa oral coradas com Feulgen. a) Núcleos corados de mucosa oral normal. b) Núcleos de mucosa oral severamente displásica.

Fonte: Adaptado de Gadiwam⁴⁶, 2014.

Em um estudo com hemócitos normais e neoplásicos de mexilhões, analisou-se aproximadamente 120 mil núcleos celulares corados com *Feulgen* em 3 estágios diferentes da doença, para quantificação do conteúdo de DNA e estudar a morfologia nuclear. Em particular, as características que permitiram a diferenciação entre núcleos neoplásicos e normais foram área nuclear, perímetro e densidade ótica³⁶.

Essa coloração também foi empregada em avaliações de lesões hiperplásicas, em doença fibrocística e carcinoma ductal *in situ*⁴⁷. Nesse estudo, o número de mitoses foi comparado e verificou-se que o carcinoma ductal *in situ* apresentou maior número de mitoses. Dada a alta especificidade dessa coloração e por ser de baixo custo, ela apresenta valores qualitativos e quantitativos com alta relevância para os estudos morfológicos nucleares.

2.6 Bioimagem em patologia

Analisadores de imagem auxiliam no processamento de dados, principalmente, quando se necessita obter dados precisos e quantitativos. Na área biomédica, os softwares de bioimagem, possibilitam avaliar o conteúdo celular em fotomicrografias gerando informações importantes com implicações diagnósticas e prognósticas, quantitativas e de baixo custo⁷.

A morfometria celular e nuclear pode ser realizada por diversos *softwares*, que variam com o número de ferramentas disponíveis, tratamento e correção de pixels das imagens, conversão das unidades de pixels para micrômetros. Há diversos *softwares* de imagens disponíveis gratuitos e de código aberto como os do Instituto Nacional de Saúde

(NIH)^{48, 49}, sendo o primeiro e mais difundido o *ImageJ*. Sua vantagem é que os usuários e desenvolvedores conseguem contribuir criando novos plug-ins. Embora o grande número de plug-ins com diferentes formas de usabilidade e documentação pode dificultar na utilização do mesmo e a escolha de protocolos que sejam reprodutíveis⁵⁰.

Entre os softwares criados posteriormente, vale destacar o *CellProfiler*, que também é gratuito e de código aberto. O mesmo traz a vantagem para os pesquisadores de permitir o download do protocolo de trabalho on-line (isto é, um "pipeline") ou criar os seus próprios. Estes *pipelines* são fáceis de salvar, reutilizar e compartilhar, propiciando fortemente a reprodutibilidade científica⁵⁰.

Portanto, há diversos *softwares* de bioimagem com interfaces variadas e características específicas que podem auxiliar os patologistas e toda a comunidade científica de diversas formas, desde a prática clínica favorecendo diagnósticos e prognósticos como na pesquisa. Os mais indicados para a comunidade científica são aqueles que apresentam um menor número de parâmetros para mensuração, afim de tornar a análise morfométrica mais reprodutível, acessível e com interfaces atrativas⁷. Metodologias que apresentam resultados positivos, com maior reprodutibilidade e de baixo custo são indispensáveis tanto para o meio científico quanto para o diagnóstico.

A mensuração do tamanho nuclear foi usada pela primeira vez em humanos como fator prognóstico em adenocarcinomas de próstata em 1982⁵¹. Desde então houve evolução tecnológica para avaliação nuclear principalmente empregando os softwares de bioimagem. Na área da oncologia, essas ferramentas são empregadas principalmente para pesquisas, as quais avaliam de forma importante as características de pleomorfismo nuclear e a presença de figuras mitóticas. Essas características são as mais comuns nos tumores mamários caninos e estão correlacionados intimamente com o grau histológico, haja vista que a alta proliferação acompanha uma maior agressividade do tumor⁵². Desta forma, a fim de entender melhor as características nucleares nesses processos, mais estudos nessa área precisam ser desenvolvidos, a fim de assegurar o uso dessa metodologia para além das pesquisas, mas aplicada à rotina do diagnóstico patológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar morfometria nuclear em neoplasias malignas de mama em cadelas e verificar se a coloração de Feulgen é eficiente para esta análise.

3.1 Objetivos Específicos

- Realizar morfometria nuclear dos seguintes parâmetros: área; perímetro; *Feret* e circularidade em carcinomas mamários de cadelas;
- Definir o grau de malignidade por meio da avaliação histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas;
- Correlacionar os dados morfométricos nucleares com a graduação de malignidade dos diferentes tipos neoplásicos.

REFERÊNCIAS

1. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
2. Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127381.
3. Sanches RC, Regonato E, Zilioto L, Vicenti FAM, Daleck CR, editors. Doenças neoplásicas em cães: estudo retrospectivo de 535 casos. . Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária; 2000; Goiânia: Editora da Universidade Federal do Goiás.
4. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*. 2013;9:1.
5. Sonnenschein C, Soto AM. Cancer Metastases: So Close and So Far. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(11).
6. Sonnenschein C, Soto A. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2016;122(1):70-6.
7. Andrea Carlos Eduardo, Bleggi-Torres Luiz Fernando, Seixas AMTd. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44: 51-7.
8. Eduardo C. Filippi-Chiela MMO, Bruno Jurkovski, Sidia Maria Callegari-Jacques, Vinicius Duval da Silva, Guido Lenz. Análise Morfométrica Nuclear (NMA): Triagem de Senescência, Apoptose e Irregularidades Nucleares. *Plos One*. 2012.
9. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):677-87.
10. Baak JP. Basic points in and practical aspects of the application of diagnostic morphometry. *Pathol Res Pract*. 1984;179(2):193-9.
11. Mello MLS, Vidal BC. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochem*. 2017;119(6):603-9.
12. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011;4(2):153-75.
13. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front Oncol*. 2018;8.

14. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 1984;44(10):4217-23.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
16. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 23):5591-6.
17. Jones TC, Hunt RD, King NW. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. In: *Patologia veterinária*. . 6 ed ed. São Paulo: Manole; 2000.
18. Chow KH, Factor RE, Ullman KS. The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(3):196-209.
19. World Health Organization (WHO). Cancer 2018. Acesso em: 20 de outubro de 2019. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
20. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
21. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *J Small Anim Pract.* 2002;43(6):240-6.
22. Vascellari M, Capello K, Carminato A, Zanardello C, Baioni E, Mutinelli F. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. *Prev Vet Med.* 2016;126:183-9.
23. Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Vet Scand.* 2018;60.
24. Moe L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl.* 2001;57:439-43.
25. Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, von Sandersleben J. Canine Malignant Mammary Tumours II. Adenocarcinomas, Solid Carcinomas and Spindle Cell Carcinomas. *Vet Pathol.* 1972;9(6):447-70.
26. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2011;48(1):117-31.
27. Clemente M, Perez-Alenza MD, Illera JC, Pena L. Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.* 2010;47(2):265-74.
28. Misdorp W, Else R, Hellme'n E, Lipscomb T. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat* Armed Forces Institute of Pathology 1999.

29. Reddy KL, Feinberg AP. Higher order chromatin organization in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(2):109-15.
30. Dahl KN, Ribeiro AJ, Lammerding J. Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ Res.* 2008;102(11):1307-18.
31. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 10):1477-86.
32. Dey P. Cancer nucleus: morphology and beyond. *Diagn Cytopathol.* 2010;38(5):382-90.
33. Cremer T, Cremer C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem.* 2006;50(3):161-76.
34. Nishihira M, Nakazato Y, Tsuchida S, Kuroda H, Imai Y, Chida M. Nuclear Morphometry of Lung Squamous Cell Carcinomas in Cytologic Study. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;24(6):303-7.
35. Friedl P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(1):55-64.
36. Carella F, De Vico G, Landini G. Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels. *PLoS One.* 2017;12(3).
37. Di Donato G, Laufer-Amorim R, Palmieri C. Nuclear morphometry in histological specimens of canine prostate cancer: Correlation with histological subtypes, Gleason score, methods of collection and survival time. *Res Vet Sci.* 2017;114:212-7.
38. Kashyap A, Jain M, Shukla S, Andley M. Study of nuclear morphometry on cytology specimens of benign and malignant breast lesions: A study of 122 cases. *J Cytol.* 2017;34(1):10-5.
39. Simeonov R, Simeonova G. Computerized morphometry of mean nuclear diameter and nuclear roundness in canine mammary gland tumors on cytologic smears. *Vet Clin Pathol.* 2006;35(1):88-90.
40. Pasquale Chieco MD. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochemistry and Cell Biology.* 1999;111(5):345-58.
41. Lyon H, EK S, Preto P, Barer M, M-C B. Standardized staining methods: Feulgen-Rossenbeck reaction for desoxyribonucleic acid and periodic acid-Schiff (PAS) procedure. 2009.
42. Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol.* 1999;111(5):345-58.
43. Hardie DC, Gregory TR, Hebert PD. From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(6):735-49.

44. Vendrely RV. La teneur du noiau cellulaire en acide désoxyribonucléique très les organes, les individus e les espèces animales. C *Experientia*. 1948.
45. Patau K, Swift H. The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. *Chromosoma*. 1953;6(2):149-69.
46. Gadiwan M, Madhushankari G, Mandana D, Praveen S, Selvamani M, Pradeep D. Nuclear features in different grades of epithelial dysplasia in leukoplakia: A computer assisted microscopic study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18(2):194-200.
47. De Potter CR, Praet MM, Slavin RE, Verbeeck P, Roels HJ. Feulgen DNA content and mitotic activity in proliferative breast disease. A comparison with ductal carcinoma in situ. *Histopathology*. 1987;11(12):1307-19.
48. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):1-26.
49. Rasband WS. ImageJ U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA2019 acesso em: 10/07/2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.
50. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamentsky L, Cimini BA, Karhohs KW, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol*. 2018;16(7):e2005970.
51. Diamond DA, Berry SJ, Jewett HJ, Eggleston JC, Coffey DS. A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. *J Urol*. 1982;128(4):729-34.
52. Dutra AP, Granja NV, Schmitt FC, Cassali GD. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(11):1673-81.

CAPÍTULO 2 – MEDIDAS MORFOMÉTRICAS NUCLEARES SÃO MAIORES EM CÂNCER DE MAMA DE CADELAS DE MAIOR MALIGNIDADE

RESUMO

A avaliação morfométrica de imagens histológicas pode fornecer informações importantes para o diagnóstico de câncer. Dentre as características microscópicas avaliadas para determinar o grau de malignidade, a morfologia do núcleo das células neoplásicas é um critério valioso. Na atualidade, existem diversos softwares que podem auxiliar na análise de imagens microscópicas dessas células, o que permite resultados quantitativos reprodutíveis e a redução da subjetividade. Diante disto, o objetivo deste estudo foi verificar se a coloração de Feulgen é eficiente na avaliação morfométrica do núcleo celular e se há diferenças entre as medidas morfométricas do núcleo de neoplasias malignas de cadelas. Para tal, foram confeccionadas lâminas histológicas com a técnica de macro arranjo tecidual (TMA) dos subtipos tumorais carcinoma tubulopapilar, carcinoma complexo e carcinoma sólido, as quais foram coradas pelo método histoquímico de Feulgen. Em cada unidade amostral das lâminas de TMA foram fotografados 5 campos aleatórios, em uma ampliação de 400X em microscópio com câmera acoplada. A avaliação nuclear foi realizada com auxílio do software ImageJ pela ferramenta *threshold*. A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6.0. A coloração de Feulgen se mostrou eficiente para a análise morfométrica nuclear. Os carcinomas sólidos apresentaram maior área média ($85.40\mu\text{m}^2 \pm 0.3159$) e perímetro médio ($48.33\mu\text{m}^2 \pm 0.1217$), quando comparados com o carcinoma tubulopapilar e complexo ($P < 0,0001$). Os resultados indicam que neoplasias malignas de maior grau de malignidade apresentam valores morfométricos nucleares maiores e que os parâmetros área e perímetro são melhores para comparação entre os diferentes tipos tumorais e o parâmetro circularidade é mais eficiente para diferenciar graus de malignidade em um mesmo tipo tumoral.

Palavras chaves: carcinoma, morfologia do nuclear, neoplasias.

NUCLEAR MORPHOMETRIC MEASURES ARE GREATER IN CANINE BREAST CANCER WITH GREATER MALIGNITY

ABSTRACT

Morphometric evaluation of histological images can provide important information for the diagnosis of cancer. Among the microscopic characteristics evaluated to determine the degree of malignancy, the morphology of the nucleus of neoplastic cells is a valuable criterion. Currently, there are several software that can assist in the analysis of microscopic images of these cells, which allows for reproducible quantitative results and the reduction of subjectivity. Given this, the objective of this study was to verify if Feulgen staining is efficient in the morphometric evaluation of the cell nucleus and if there are differences between the morphometric measurements of the nucleus of malignant neoplasms of bitches. For this purpose, histological slides were made using the macro tissue arrangement (TMA) technique of tumor subtypes, tubulopapillary carcinoma, complex carcinoma and solid carcinoma, which were stained by Feulgen's histochemical method. In each sampling unit of the TMA slides, 5 random fields were photographed, at a magnification of 400X under a microscope with attached camera. The nuclear evaluation was performed with the aid of the ImageJ software using the threshold tool. The statistical analysis of the data was performed with the aid of the GraphPad Prism 6.0 software. Feulgen staining proved to be efficient for nuclear morphometric analysis. Solid carcinomas had a larger mean area ($85.40\mu\text{m}^2 \pm 0.3159$) and average perimeter ($48.33\mu\text{m}^2 \pm 0.1217$), when compared to complex and tubulopapillary carcinoma ($P < 0.0001$). The results indicate that malignant neoplasms with a higher degree of malignancy have higher nuclear morphometric values and that the parameters area and perimeter are better for comparison between different tumor types and the circularity parameter is more efficient to differentiate degrees of malignancy in the same tumor type.

Keywords: carcinoma, nuclear morphology, neoplasms.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama em cadelas, principalmente nas não-castradas têm apresentado elevada incidência^{1,2}. Deste modo, estes animais têm-se apresentado como valioso modelo de estudo pré-clínico espontâneo para câncer de mama. Os tumores malignos acumulam defeitos genéticos que promovem a seleção de clones celulares com aumento da atipia morfológica e maior capacidade de invadir tecidos adjacentes e metastatizar³.

Das alterações mamárias em cadelas, cerca de 50% são neoplasias malignas. Nessa localização, os tumores mais comumente diagnosticados são: adenoma tubular, adenoma papilar, carcinoma tubulopapilar, carcinoma sólido, carcinoma complexo e carcinosarcoma⁴. Os critérios mais significativos para o diagnóstico microscópico em hematoxilina e eosina dessas lesões são: o tipo histológico, pleomorfismo nuclear e celular, índice mitótico, presença de áreas de necrose intratumorais, invasão peritumoral e linfática e metástase de linfonodos regionais⁵.

Histologicamente, as neoplasias malignas possuem células com núcleos aumentados e nucléolos proeminentes, sendo a avaliação nuclear uma das características mais importantes para o diagnóstico tumoral. Os núcleos das células cancerosas apresentam elevado grau de pleomorfismo, exibindo-se aumentados e muitas vezes dobrados ou até sobrepostos uns aos outros. Além disso, possuem alterações nos padrões da cromatina como agregados grosseiros da mesma⁶.

Atualmente, a técnica de coloração padrão ouro na patologia para diagnóstico tumoral é a de hematoxilina e eosina (H&E). Esta coloração cora os componentes celulares e teciduais, a depender de suas características físico-químicas, em áreas eosinofílicas ou basofílicas. Assim, a maioria das organelas celulares e da matriz extracelular são eosinofílicas, enquanto o núcleo, o retículo endoplasmático rugoso e os ribossomos são basofílicos⁷. Portanto, novas técnicas de coloração específicas para corar o núcleo celular, como Feulgen, técnica histoquímica específica e sensível para DNA¹², são de extrema importância para possibilitar análises morfométricas das alterações nucleares de forma mais precisa.

As alterações celulares e nucleares que acontecem no microambiente tumoral são importantes na avaliação da progressão tumoral. A avaliação quantitativa de alterações no perfil, tamanho e forma é frequentemente correlacionada em células cancerosas⁸. Em estudo com carcinomas mamários de cadelas foi avaliado o comportamento metastático em linfonodos regionais e verificou-se que as lesões com linfonodos positivos apresentavam

células com maior área nuclear média que os carcinomas com linfonodos negativos⁹. Esse achado indica que a morfometria nuclear auxilia positivamente no prognóstico dos pacientes oncológicos.

Alterações celulares sempre fizeram parte da avaliação histológica dos tumores, porém, de maneira qualitativa. Considerando a necessidade de reduzir a subjetividade nas avaliações histológicas de neoplasias caninas, o objetivo deste estudo foi verificar se a coloração de Feulgen é específica para marcar o núcleo celular, e eficiente em permitir a obtenção de parâmetros para a análise morfométrica nuclear em neoplasias mamárias malignas de cadelas, a fim de que esses resultados possam dar subsídios à rotina diagnóstica da oncologia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e seleção das amostras

Toda a análise experimental foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob número de protocolo 016/18 (Anexo 1). As análises foram realizadas no Laboratório de Histotécnica, Morfometria e Inovação (LHiMI) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG.

Foram selecionados 300 blocos de parafina contendo fragmentos de neoplasias mamárias malignas de cadelas, provenientes do serviço de diagnóstico histopatológico veterinário particular advindos de clínicas veterinárias de Goiânia, referentes ao período de 2015 a 2018. Os blocos foram provenientes de amostras fixadas em formol tamponado a 10% e submetidas ao processamento histológico de rotina em no máximo 48 horas após o recebimento. O processamento foi realizado de acordo com técnica histológica de rotina para emblocagem em parafina (desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina). A partir desses blocos foram confeccionadas novas lâminas histológicas com cortes de 4µm de espessura, as quais foram coradas em H&E de acordo com o protocolo do LHiMI/IPTSP.

Como critério de inclusão foram considerados o estado de conservação dos blocos (sem rachaduras, fragmentos com boa inclusão na parafina) e como de exclusão a não preservação dos blocos e blocos que apresentavam dúvidas diagnósticas na reavaliação das lâminas atualizado e padronizado de acordo com Misdorp et al¹⁰.

2.2 Grupos e delineamento experimental

O estudo foi constituído por três grupos dos seguintes diagnósticos histomorfológicos: carcinoma tubulopapilar (66 amostras), carcinoma complexo (14 amostras) e carcinoma sólido (19 amostras). Além do diagnóstico histomorfológico, procedeu-se a graduação histológica dos casos de acordo com o proposto por Elston e Ellis, (1991) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Parâmetros e pontos para graduação histológica de neoplasia mamária em cadelas¹¹

CRITÉRIOS AVALIADOS	PONTOS
Formação tubular - mais de 75% do tumor formado por túbulos	1
Formação tubular - de 10% a 75% de formações tubulares	2
Formação tubular - túbulos ocupando 10% ou menos do tumor	3
Contagem mitótica: 0-8 mitoses	1
Contagem mitótica: 9-16 mitoses	2
Contagem mitótica: acima de 17 mitoses	3
Pleomorfismo nuclear: núcleos pequenos e regulares	1
Pleomorfismo nuclear: aumento moderado no tamanho e organização dos núcleos	2
Pleomorfismo nuclear: pleomorfismo acentuado, com grande variação no tamanho e forma dos núcleos	3
GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	ESCORE
Contagem de 3-5 pontos	1
Contagem de 6-7 pontos	2
Contagem de 8-9 pontos	3

Para cada parâmetro foi atribuído um escore numérico de um a três. A soma destes determinou a graduação da neoplasia. As lâminas selecionadas foram analisadas ao microscópio de luz sob 5 campos em cada lâmina para a avaliação dos parâmetros e determinação da graduação histológica. Assim, definido o diagnóstico histomorfológico e a graduação histológica, realizou-se a confecção dos blocos pela técnica de macroarranjo tecidual (TMA) e procedeu-se a coloração de Feulgen para morfometria nuclear. Posteriormente, realizou-se a morfometria nuclear em cada amostra.

2.3 Técnica de macroarranjo tecidual (TMA)

Foram confeccionados blocos de TMA para cada tipo histomorfológico de câncer de mama de cadelas. Esta técnica consistiu na retirada de pequenos cilindros de tecidos (0,5

mm a 2 mm de diâmetro) de blocos de parafina doadores, os quais foram transferidos para um bloco de parafina vazio, denominado de bloco receptor, possuindo 50 cilindros de amostras diferentes do mesmo tipo histomorfológico. Esta técnica possibilita a análise de maior número de amostras por lâmina de maneira otimizada, padronizada, com redução no gasto de tempo de processamento tanto para coloração quanto para a análise das mesmas.

2.4 Coloração de Feulgen e morfometria nuclear

As lâminas dos TMAs foram submetidas ao processo de coloração pelo método de *Feulgen*. Primeiramente, as lâminas passaram pelo processo de desparafinização por 15 minutos em estufa e foram lavadas em três banhos de xilol. Na sequência, as lâminas foram submetidas ao processo de hidratação em álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70% e água. Então, estas foram submergidas por 15 minutos em solução HCl 5 mol/L, lavadas em água corrente e colocadas na solução contendo reagente *Schiff* por 15 minutos em câmara escura. Após isso, as lâminas passaram por dois banhos de água em temperatura ambiente de 5 minutos cada. Posteriormente, passaram pelo processo de desidratação, diafanização e montagem das lâminas.

As lâminas confeccionadas foram analisadas em fotomicroscópio de luz e cinco campos aleatórios foram capturados em câmera digital (Leica® DMC 2900) acoplada ao microscópio em aumento de 400X. Sucessivamente foi realizada a avaliação nuclear segundo Carella (2017)¹², com auxílio do software *ImageJ 1.52a* (*National Institutes of Health, USA*), de aproximadamente 50 núcleos/campo para mensuração de:

- Área presente dentro do perímetro;
- Perímetro (comprimento limite da região nuclear);
- Circularidade ($4 * \pi * \text{Área} / \text{Perímetro}^2$): indica o quão próximo a forma possui de um círculo. Valores próximos de 1,0 indica um círculo perfeito;
- Feret (média da distância entre duas linhas paralelas tangentes à projeção da partícula);

Para a análise das fotomicrografias fez-se a calibração da unidade de medida e a conversão de pixel para micrômetro com régua de calibração para objetiva de 40x no fotomicroscópio Leica® DMC 2900. Todas as fotomicrografias passaram por ajuste automático de brilho. Em seguida, foi escolhido o canal de cor verde (com a função *Split channels*), e aplicado *threshold* (figura 1). Desta forma, foi possível obter a imagem binária

convertida em escala de cinza (núcleos corados de preto e o restante da imagem em branco). Então, com a imagem binária, foi aplicado a função *watershed* delimitando as áreas a serem mensuradas. Em seguida, foi feita a análise das mesmas com a função *analyse particles* com uma faixa de alcance das partículas a serem analisadas pré-definida (somente valores de $40\mu\text{m}$ até $170\mu\text{m}$), afim de excluir partículas que não eram representativas a núcleos neoplásicos. A escolha desse variação de medida deve-se a resultados anteriormente publicados que demonstraram que núcleos celulares de tumores benignos mamários em mulheres¹³ apresentam área média de $24,86\mu\text{m}^2$ e de tumores malignos área de $51,43\mu\text{m}^2$. Outro estudo demonstrou que núcleos de tumores malignos de cadelas¹⁴ apresentam variação de $66,83\mu\text{m}^2$ até $143,71\mu\text{m}^2$. Além disso, outro estudo¹⁵ demonstrou que núcleos de células de defesa apresentavam medida média de área nuclear de $31,9\mu\text{m}^2$.

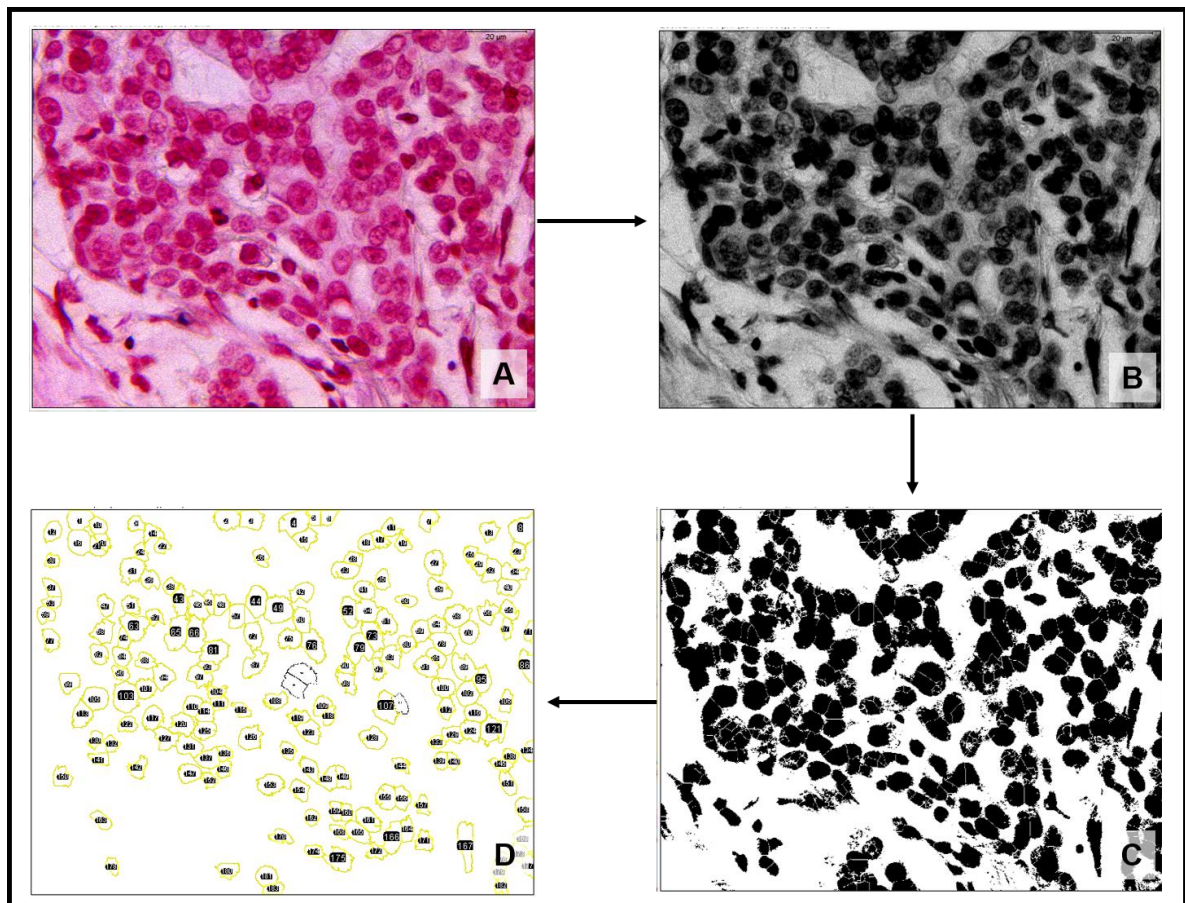


FIGURA 5 - Etapas da análise morfométrica utilizando *Image J* – fotomicrografia de Carcinoma Tubular, grau II, corado com *Feulgen* (aumento de 400X). A) aquisição da imagem pelo software com correção de brilho. B) escolha da imagem com o canal de cor verde (função *Split chanel*). C) Imagem após ajuste *threshold* e aplicação do processo de separação de partículas (*watershed*). D) Partículas a serem mensuradas após função *analyse particles* com intervalo de seleção no tamanho de partículas de 40-170, a fim de eliminar núcleos de células de defesa ($31,9\mu\text{m}^2$)¹⁵.

Foram incluídos núcleos de células epiteliais neoplásicas mamárias com características de malignidade, como nucléolos evidentes e cromatina grosseiramente condensada, evitando núcleos de células estromais e áreas necróticas. Células com morfologia sobreposta ou distorcida também foram excluídas das análises.

2.5 Análise estatística

Considerando a normalidade dos dados pelo teste de *Shapiro-Wilk*, para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey para comparação entre os diagnósticos histomorfológicos. Utilizou-se teste *t student* entre os grupos com graus diferentes de malignidade dentro do mesmo diagnóstico histomorfológico. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism 6.0.

3. RESULTADOS

A coloração de Feulgen permitiu observar de maneira nítida em coloração rósea acentuada o núcleo celular, em contraste com os outros componentes do tecido que se apresentavam sem coloração. Desta forma, foi possível identificar nitidamente a estrutura nuclear de todas as células do tecido (Figura 2).

Um total de 25.180 núcleos foram analisados, sendo 8.878 núcleos de carcinoma tubular, 8.604 núcleos de carcinoma sólido e 7.698 núcleos de carcinoma complexo. Das 99 amostras, foram analisados um total de 66 casos de carcinoma mamário tubulopapilar, sendo 55 amostras correspondentes a grau I e 11 amostras de grau II, 19 casos de carcinoma sólido, sendo 10 amostras de grau II e 9 amostras de grau III e 14 casos de complexo todos de grau I. Os núcleos de carcinoma tubulopapilar (figura 3A) apresentaram moderado e acentuado pleomorfismo, estando organizados em duas ou mais fileiras de células epiteliais que formam aspecto tubular. Apresentam-se hipercromáticos, cromatina desorganizada e nucléolos dispostos mais na periferia nuclear. Nas amostras de carcinoma sólido (figura 3B), os núcleos apresentavam acentuado pleomorfismo nuclear, distribuídos em fileiras ou cordões sólidos e hipercromáticos, distribuídos sem padrão de uniformidade, com cromatina desorganizada e nucléolos predominantemente na periferia nuclear. Já as células epiteliais e mioepiteliais do carcinoma complexo (figura 3C) organizam-se em túbulos ou feixes irregulares, com núcleos

centrais que variam de formatos redondos a ovoides com cromatina pontilhada e um pequeno nucléolo central.

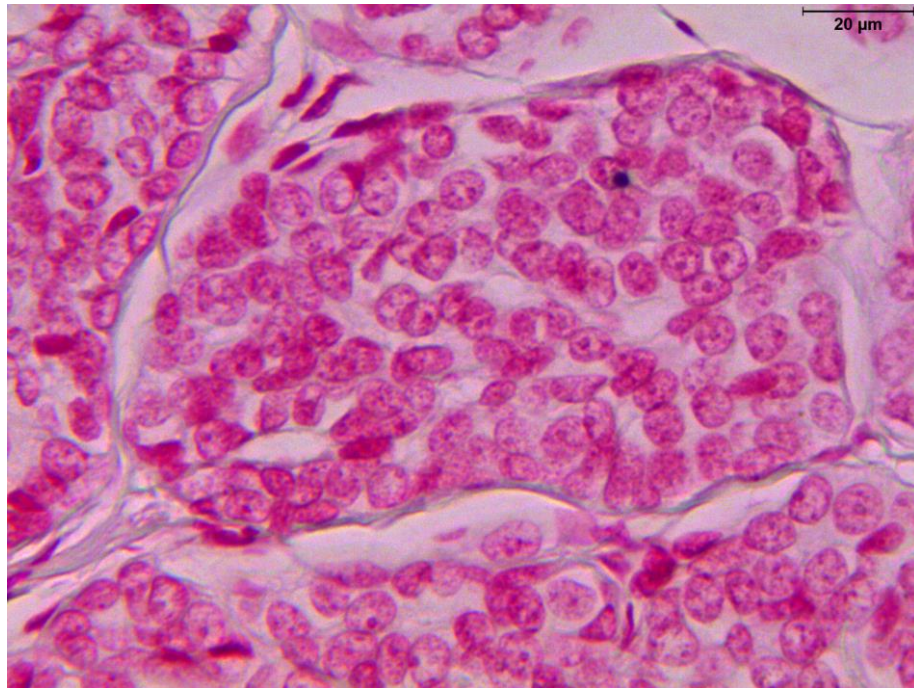


FIGURA 6 – Fotomicrografia de carcinoma mamário de cadela. Núcleos de células neoplásicas malignas corados em rosa acentuado pela coloração de Feulgen. É possível notar a distinção dos núcleos para o restante do tecido que se apresenta sem coloração. Feulgen, 400X.

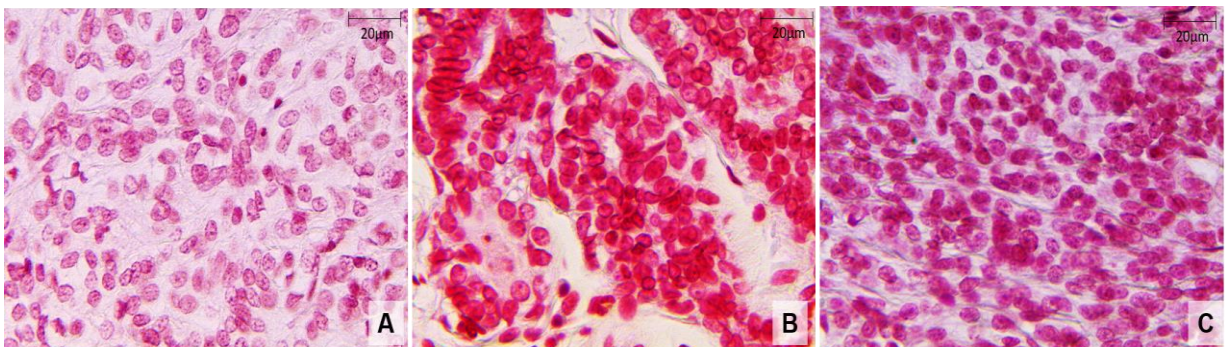


FIGURA 3- Fotomicrografias de carcinomas mamários de cadelas. A) Carcinoma tubulopapilar com moderada anisocariose. B) Carcinoma complexo com acentuada anisocariose. C) Carcinoma sólido com acentuada anisocariose. Feulgen, 400X.

O carcinoma sólido apresentou área e perímetro nuclear significativamente maior (Tabela 1) quando comparado ao carcinoma complexo e tubulopapilar. O valor de Feret foi significativamente maior no carcinoma tubulopapilar comparando-se ao carcinoma complexo

e ambos não tiveram diferença estatística com carcinoma sólido. Por fim, a circularidade no carcinoma complexo apresentou valor significativamente maior aos demais.

TABELA 1: Média, desvio padrão e valor de p de área nuclear, perímetro nuclear, Feret e circularidade de carcinomas mamários de cadelas

Diagnóstico	Área μm^2 (média±desvio padrão)	(p)
Carcinoma Tubulopapilar	77,00 ± 0,3138 ^a	< 0,0001
Carcinoma Complexo	80,75 ± 0,3650 ^b	
Carcinoma Sólido	85,40 ± 0,3159 ^c	
Perímetro Nuclear μm^2 (média±desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	45,13 ± 0,1233 ^a	< 0,0001
Carcinoma Complexo	47,39 ± 0,1383 ^b	
Carcinoma Sólido	48,33 ± 0,1217 ^c	
Feret μm^2 (média±desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	13,69 ± 0,096 ^a	0,0125
Carcinoma Complexo	13,44 ± 0,031 ^b	
Carcinoma Sólido	13,50 ± 0,026 ^{ab}	
Circularidade μm^2 (média±desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	0,1131 ± 0,0021 ^a	< 0,0001
Carcinoma Complexo	0,4641 ± 0,001 ^b	
Carcinoma Sólido	0,2355 ± 0,0026 ^c	

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos por teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Dentre os graus histológicos (Tabela 2), o carcinoma tubulopapilar grau I apresentou menor área, perímetro e circularidade em comparação com carcinoma tubulopapilar de grau II. Somente o valor de Feret apresentou-se maior no grau I em relação ao grau II. Entre os graus histológicos no carcinoma sólido observou-se maior área, perímetro e Feret para o grau II quando comparado aos de grau III, sendo a circularidade o único parâmetro maior para os carcinomas sólidos grau III. Para o carcinoma complexo não foi possível a análise quanto ao grau histológico, pois todas as amostras eram de grau I.

TABELA 2: Média, desvio padrão e valor de p de área nuclear, perímetro nuclear, Feret e circularidade de carcinomas mamários de cadelas de acordo com o grau de malignidade

Diagnóstico (p)	Grau histológico (média e desvio padrão)	
	Área μm^2	
Carcinoma Tubulopapilar (p= 0.0001)	Grau I (67,34 \pm 0,4060)	Grau II (82,85 \pm 0,4207)
Carcinoma Sólido (p=0.0121)	Grau II (88,39 \pm 0,6841)	Grau III (86,36 \pm 0,4717)
Carcinoma Complexo	Grau I (80,75 \pm 0.3650)	---
Perímetro Nuclear μm^2		
Carcinoma Tubulopapilar (p= 0.0001)	Grau I (41,44 \pm 0,1804)	Grau II (47,21 \pm 0,1570)
Carcinoma Sólido (p=0.0001)	Grau II (49,37 \pm 0,2750)	Grau III (48,02 \pm 0,1346)
Carcinoma Complexo	Grau I (47.39 \pm 0.1383)	---
Feret μm^2		
Carcinoma Tubulopapilar (p=0.0069)	Grau I (14.02 \pm 0.247)	Grau II (13.49 \pm 0.035)
Carcinoma Sólido (p=0.0006)	Grau II (13.66 \pm 0.054)	Grau III (13.45 \pm 0.029)
Carcinoma Complexo	Grau I (13.44 \pm 0.031)	---
Circularidade μm^2		
Carcinoma Tubulopapilar (p=0.0001)	Grau I (0.0153 \pm 0.00157)	Grau II (0.0169 \pm 0.00154)
Carcinoma Sólido (p=0.0001)	Grau II (0.149 \pm 0.0051)	Grau III (0.1551 \pm 0.0039)
Carcinoma Complexo	Grau I (0.4641 \pm 0.001)	---

Nível de significância de 5% (p<0,05) indica diferença estatística entre os grupos pelo Teste t.

4. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que demonstra a aplicabilidade da coloração de Feulgen para estudo de morfometria nuclear de neoplasias mamárias malignas de cadelas e que demonstra as diferenças morfométricas do núcleo entre diferentes subtipos desses cânceres e entre os graus de malignidade. A coloração de Feulgen permitiu realizar a morfometria nuclear no presente estudo e possibilitou a aquisição de resultados quantitativos de parâmetros nucleares como tamanho nuclear (área, perímetro), forma nuclear (circularidade) e os mesmos permitiram quantificar o grau de pleomorfismo e irregularidades nucleares nos tipos tumorais avaliados. Diversos estudos relatam o uso da coloração de Feulgen e seu bom desempenho nos estudos de morfometria nuclear¹⁶⁻¹⁹. Além disso, trata-se de um método histoquímico simples, não oneroso e confiável, o qual possibilita o estudo nuclear em células cancerosas e os parâmetros avaliados podem auxiliar no diagnóstico das neoplasias mamárias caninas. Assim, pode-se sugerir que esse método auxilie a diferenciar casos benignos de malignos, bem como na graduação de malignidade, colaborando com diagnóstico definitivo confiável.

Os resultados do presente estudo demonstram que os parâmetros de área nuclear e perímetro foram significativamente maiores em carcinomas sólidos quando comparados aos

carcinomas complexo e tubulopapilares. Em estudo com objetivos e resultados semelhantes ao presente trabalho, no entanto, realizado com células obtidas por biópsia por aspiração com agulha fina e coradas com Hemacolor (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analisadas pelo Image Pro Plus, evidenciou-se média de área nuclear para carcinoma tubular de $89.70 \mu\text{m}^2 (\pm 15.02)$ e para carcinoma sólido $111.11 \mu\text{m}^2 (\pm 28.38)$, valor médio de perímetro para carcinoma tubular foi de $34.47 \mu\text{m} (\pm 4.27)$ e para carcinoma sólido $38.62 \mu\text{m} (\pm 6.03)$ ¹⁴, similar ao do presente estudo. Os achados demonstram que estes parâmetros apresentam-se maiores em lesões malignas, resultado de maior atividade biológica nuclear e acúmulo de material genético anormal durante a carcinogênese²⁰.

Entre os tipos de câncer de mama nas cadelas os carcinomas sólidos apresentam comportamento biológico mais agressivo em comparação aos carcinomas tubulopapilares e os carcinomas complexos²¹, o que pode indicar que as alterações nucleares sejam mais evidentes nos tipos mais agressivos, o que corresponde aos achados deste estudo. Resultados similares foram encontrados por Kashyap et al.¹³, em estudo comparativo entre citologia de neoplasias mamárias benignas e malignas de mulheres, sendo que as neoplasias malignas apresentaram valores maiores de área nuclear. A morfometria nuclear também foi utilizada em estudo²² com câncer de próstata em cães, que evidenciou que núcleos de células neoplásicas eram maiores, com maior variação no tamanho e forma nuclear em comparação às células normais e hiperplásicas. Além disso, os autores encontraram diferenças significativas entre os cânceres de próstata mais diferenciados (acinar e ductal) e menos diferenciados (cribriforme e sólido).

O parâmetro utilizado como fator de forma neste estudo foi a circularidade¹³, o qual demonstrou que o carcinoma complexo apresenta núcleos com formas mais próximas de um círculo quando comparado aos núcleos do carcinoma sólido e do carcinoma tubular. Já o parâmetro de Feret, o qual é utilizado para mensurar o diâmetro de uma partícula com margens irregulares, neste estudo, demonstrou que o carcinoma complexo foi menor em comparação ao carcinoma tubulopapilar. Essas duas medidas indicam o grau de anisocariose¹³ e no presente estudo verificou-se que em carcinomas complexos os núcleos são mais arredondados e com menos irregularidades em comparação aos demais subtipos. Em estudo²³ avaliando carcinomas renais não-metastáticos em humanos, descreveram que a forma nuclear seria o fator mais importante para prever a recorrência neoplásica e os tumores compostos por núcleos mais arredondados apresentavam pior prognóstico. Entretanto, em outro estudo²⁴ com osteossarcomas, os autores relatam que pacientes com núcleos tumorais grandes e redondos apresentavam prognósticos melhores que pacientes com núcleos pequenos e polimórficos. Considerando os achados do presente estudo, o carcinoma complexo apresentou

núcleos mais redondos, entretanto, não é o tipo tumoral mais agressivo e com pior prognóstico para os pacientes relatados em literatura^{1,10,21}. Portanto, os parâmetros de forma nuclear são específicos para cada tipo tumoral e devem ser usados com cautela para definir prognósticos, carecendo de mais estudos para melhor utilização.

Quanto aos graus histológicos, os carcinomas tubulares apresentaram valores médios de área, perímetro e circularidade menor no grau I quando comparado ao grau II, o que corresponde ao aumento do tamanho nuclear e o acúmulo de material genético anormal nos cânceres de maior grau de malignidade²⁰. No carcinoma sólido, a área, perímetro e Feret foram maiores no grau II em comparação ao grau III e, somente, circularidade foi menor no grau III. Os nossos achados em relação a circularidade foram semelhantes a outro estudo²⁴ que descreve que núcleos tumorais grandes e redondos apresentavam prognósticos melhores que pacientes com núcleos pequenos e polimórficos. Assim, o critério circularidade parece ser um melhor critério de avaliação morfométrica para indicar pior grau de malignidade em cânceres. No entanto, estudos com associação às informações clínicas são relevantes para melhor entendimento dos resultados do presente estudo.

5. CONCLUSÕES

A coloração de Feulgen foi eficiente para permitir a análise morfométrica do núcleo celular de neoplasias malignas. Nos parâmetros área e perímetro, o carcinoma sólido apresentou maior medida nuclear; no parâmetro Feret o carcinoma tubulopapilar apresentou maior medida e no parâmetro circularidade o carcinoma complexo apresentou maior medida. Os resultados indicam que os parâmetros área e perímetro são melhores para comparação entre os diferentes tipos tumorais e o parâmetro circularidade é mais eficiente para diferenciar graus de malignidade em um mesmo tipo tumoral.

REFERÊNCIAS

1. Cassali GD, Lavalle GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2011;4(2):153-75.
2. Pena L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2014;51(1):127-45.
3. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
4. Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127381.
5. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. 2011;48(1):117-31.
6. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):677-87.
7. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(1):12-32.
8. Bignold LP, Coghlan BL, Jersmann HP. Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. 2005/12/31 ed2006. 1-24 p.
9. De Vico G, Maiolino P, Cataldi M, Mazzullo G, Restucci B. Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Res Commun*. 2007;31(8):1005-11.
10. Misdorp W, Else R, Hellme'n E, Lipscomb T. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat* Armed Forces Institute of Pathology 1999.
11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
12. Carella F, De Vico G, Landini G. Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels. *PLoS One*. 2017;12(3).
13. Kashyap A, Jain M, Shukla S, Andley M. Study of nuclear morphometry on cytology specimens of benign and malignant breast lesions: A study of 122 cases. *J Cytol*. 2017;34(1):10-5.
14. Simeonov R, Simeonova G. Computerized cytomorphometric analysis of nuclear area, nuclear perimeter and mean nuclear diameter in spontaneous canine mammary gland tumours. *Vet Res Commun*. 2007;31(5):553-8.
15. Papakonstantinou S, O'Brien PJ. "High Content Imaging for the Morphometric Diagnosis and Immunophenotypic Prognosis of Canine Lymphomas". *Cytometry B Clin Cytom*. 2014.
16. Yang X, Xiao X, Wu W, Shen X, Zhou Z, Liu W, et al. Cytological study of DNA content and nuclear morphometric analysis for aid in the diagnosis of high-grade dysplasia within oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017;124(3):280-5.

17. El Din AA, Badawi MA, Aal SE, Ibrahim NA, Morsy FA, Shaffie NM. DNA Cytometry and Nuclear Morphometry in Ovarian Benign, Borderline and Malignant Tumors. *Open Access Maced J Med Sci*. 2015;3(4):537-44.
18. Kesarkar K, Tamgadge A, Peirera T, Tamgadge S, Gotmare S, Kamat P. Evaluation of Mitotic Figures and Cellular and Nuclear Morphometry of Various Histopathological Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma: Comparative study using crystal violet and Feulgen stains. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(2):e149-e54.
19. Rao RS, Patil S, Agarwal A. Comparison and evaluation of mitotic figures in oral epithelial dysplasia using crystal violet and Feulgen stain. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(3):273-7.
20. Huang J, Bay BH, Tan PH. Nuclear morphometry and glutathione S-transferase pi expression in breast cancer. *Oncol Rep*. 2000;7(3):609-13.
21. Rasotto R, Berlato D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Vet Pathol*. 2017;54(4):571-8.
22. Di Donato G, Laufer-Amorim R, Palmieri C. Nuclear morphometry in histological specimens of canine prostate cancer: Correlation with histological subtypes, Gleason score, methods of collection and survival time. *Res Vet Sci*. 2017;114:212-7.
23. Nativ O, Sabo E, Raviv G, Medalia O, Moskovitz B, Goldwasser B. The Role of Nuclear Morphometry for Predicting Disease Outcome in Patients With Localized Renal Cell Carcinoma. *Cancer*. 1995;76(8).
24. Andrea CA, Petrili AS, Jesus-Garcia R, Bleggi-Torres LF, Alves, MTS. Large and Round Tumor Nuclei in Osteosarcoma: Good Clinical Outcome. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2011;4(2).

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

É evidente como o número de cães têm aumentado nos lares dos brasileiros, estando cada vez mais próximos a nossa rotina e às mesmas exposições de risco a doenças. Exemplos de agentes carcinogênicos que também pode afetar cães são incidência solar, poluição do ar, diversos produtos químicos tóxicos, obesidade por alimentação inadequada ou fatores genéticos ligados a raça, entre outros fatores que auxiliam no aparecimento de enfermidades como o câncer.

Os cânceres de mama têm afetado as cadelas, assim como as mulheres, e com aumento importante de novos casos a cada ano. A nossa sociedade vem evoluindo em vários aspectos, haja vista a preocupação com o bem-estar animal. Juntamente a isso, a informática tem apresentado diversos *softwares* de bioimagem que auxiliam a comunidade científica e até mesmo a clínica com diagnósticos e prognósticos mais precisos para diversas doenças, como o câncer. Assim, são disponíveis ferramentas e diversas metodologias que auxiliam na mensuração quantitativa e qualitativa do estudo morfológico das células, de maneira acessível, fácil e reprodutível.

Em nosso estudo foi possível a análise de parâmetros nucleares e evidenciamos que área nuclear, perímetro, Feret e circularidade podem ser utilizados como auxiliares no diagnóstico e determinação do grau de malignidade de câncer de mama em cadelas. Verificamos que área e perímetro apresentam valores maiores em câncer mais agressivo como o carcinoma sólido, quando comparado aos carcinomas complexo e tubular. Ressaltamos a importância de mais estudos com esse objetivo, para possíveis comparações e escolha de metodologias eficazes para o diagnóstico e também prognóstico dos pacientes oncológicos.

A coloração de Feulgen possibilitou a utilização do software de maneira automatizada, que para nós era um dos pontos principais para reduzir a subjetividade na análise. O que a coloração de Feulgen permitiu avaliar, não conseguimos com as lâminas coradas em hematoxilina e eosina, por apresentarem reduzido contraste citoplasma-núcleo e por não ser específica ao núcleo. Não obstante, a maior dificuldade encontrada durante a realização do estudo foi a perda de 30% no número de amostras analisadas. Este fato ocorreu durante o procedimento de desparafinização e histoquímica, o que reduziu o nosso número amostral. Acredita-se que a redução da área de contato entre amostra e lâmina encontrado na técnica de macro arranjo tecidual, o que corresponde um desafio encontrar estratégias para garantir a melhor fixação da amostra parafinada à lâmina histológica.

ANEXO A - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 19 de março de 2018.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO
PROTOCOLO N. 016/18**

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 28/02/2018
- Título do projeto: Imunomarcção de COX-2, de macrófagos e de vasos em neoplasias mamárias malignas de cadelas.
- Pesquisador Coordenador no SAP: Marina Pacheco Miguel
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Mara Tais de Carvalho
- Pesquisadores Participantes: Liliana Borges de Menezes, Hellen Dorneles de Deus, Leiny Paula de Oliveira, Carla Martí Castelló
- Médico Veterinário/CRMV: Marina Pacheco Miguel/ CRMV-GO 3604
- Unidade onde será realizado: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP/UFG

III - Objetivos e justificativa do projeto:

- Objetivos gerais

Verificar a imunomarcção de ciclooxygenase-2, macrófagos associados ao tumor e vasos em neoplasias mamárias de cadelas, utilizando-as como modelo de estudo.

- Objetivos específicos

- a) Verificar a localização e intensidade de marcação de COX-2, CD68 e CD31 em neoplasias mamárias de cadelas; b) Realizar a contagem de células marcadas com CD68 e CD31 em neoplasias mamárias de cadelas; c) Correlacionar a marcação de COX-2, CD68 e CD31 com o grau de malignidade de neoplasias mamárias de cadelas; d) Correlacionar a marcação de COX-2, CD68 e CD31 com o prognóstico de neoplasias mamárias de cadelas; e) Determinar a densidade vascular com a marcação por CD31; f) Verificar o valor de COX-2 como marcador prognóstico de malignidade; g) Realizar o cruzamento dos dados, relacionando os tipos histomorfológicos das neoplasias mamárias malignas com o seguimento clínico das cadelas.

Justificativa: Excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente. A causa mais importante de mortalidade em mulheres diagnosticadas com câncer de mama é a metástase do tumor primário. Em cadelas, as neoplasias mamárias correspondem a aproximadamente metade de todos os tumores diagnosticados e, dentre eles, mais de 50% são malignos. Acredita-se que os circuitos de sinalização da biologia da neoplasia mamária maligna é a mesma em espécies caninas e humanas. Além disso, acredita-se ser possível monitorar fenômenos biológicos equivalentes em tumores de mama humanos e tumores caninos correspondentes. Tal fato, possibilitaria o desenvolvimento de biomarcadores em cães para posteriormente serem aplicados também em seres humanos. Desta forma, considera-se as neoplasias mamárias espontâneas de cadelas como um modelo importante para o câncer de mama humana. Diante do exposto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar a relação entre a imunomarcção de COX-2 e a quantidade de macrófagos intratumorais e densidade de

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



vasos em neoplasias mamárias malignas de cadelas como um modelo de estudo para neoplasias mamárias malignas de humanos, visando benefícios em ambas as áreas.

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** O projeto trata-se de um método alternativo, visto que utilizará blocos de tecidos enviados para diagnóstico histopatológico, não sendo utilizados animais.
- Prevê Projeto Piloto:** Não
- Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental:** Não serão utilizados animais e sim blocos de amostra tecidual de glândula mamária.
- Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc):** Não se aplica
- Fonte de obtenção do animal:** Não se aplica
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Não se aplica
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não serão utilizados agentes infecciosos. Os alunos/pesquisadores entrarão em contato com agentes químicos que são prejudiciais à saúde. Entretanto, os riscos são minimizados com a utilização de EPIs e treinamento para o uso adequado dos reagentes.
- Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Não serão utilizados animais, serão utilizados blocos de tecidos de pacientes caninos com tumores mamários encaminhados a serviços de diagnóstico histopatológico. Juntamente com os blocos serão encaminhadas as fichas clínicas dos animais para auxiliar na pesquisa. O material biológico será processado de acordo com a rotina do laboratório de patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública para coloração das lâminas em HE para confirmação do diagnóstico histomorfológico. Posteriormente, será realizada imuno-histoquímica com marcação pelos anticorpos COX-2, CD68 e CD31.
- Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:** Não se aplica
- Grau de invasividade:** Não se aplica
- Material utilizado em outros projetos:** Sim, projetos com o estudo de marcadores.
- Método de eutanásia:** Não se aplica
- Destino do animal:** Não se aplica

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFV:** Foram apresentados todos os documentos exigidos.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** O projeto de pesquisa não utilizará animais e todos os procedimentos e riscos foram previstos e bem descritos.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufv@gmail.com