

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

TUMOR DE MAMA EM CÃES: ABORDAGEM CITOGENÉTICA

ILHÉUS – BAHIA

2013

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

TUMOR DE MAMA EM CÃES: ABORDAGEM CITOGENÉTICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto A. M. Affonso

ILHÉUS-BAHIA

2013

M827 Morais, Cíntia Suzane Dias de.
Tumor de mama em cães : abordagem citogenética / Cíntia Suzane Dias de Morais. – Ilhéus : UESC, 2013.
xiv, 94f. : il.
Orientador : Amauri Arias Wenceslau.
Co-orientadora : Paulo Roberto A. M. Affonso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Inclui referências.

1. Oncologia veterinária. 2. Cães – Doenças. 3. Tumores em animais. 4. Citogenética animal. I. Wenceslau, Amauri Arias. II. Affonso, Paulo Roberto A. M. III. Título.

CDD – 636.0896992

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

TUMOR DE MAMA EM CÃES: ABORDAGEM CITOGENÉTICA

Ilhéus – BA, 26/04/2013

Amauri Arias Wenceslau – *DSc*
UESC/DCAA
(Orientador)

Fabiana Lessa Silva – *DSc*
UESC/DCAA

Débora Diniz Bezerra – *DSc*
DCB/UESB-Jequié

ILHÉUS-BAHIA
2013

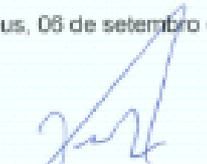


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 019/12**, relativo ao projeto intitulado **Tumor de mama em cães: Abordagem citogenética**, do **Dr. Amauri Arias Wenceslau**, está de acordo com os **Princípios Éticos da Experimentação Animal**, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UESC)**, e foi aprovado na reunião de **06/09/2012**.

Ilhéus, 06 de setembro de 2012.


Prof. Carlos Roberto C. Silva
Presidente do CEUA - UESC
Cel: 73.330.482-1

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Luci Dias Silva de Moraes, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié.

À Profa. Dra. Elisângela Barbosa da Silva, diretora do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz, e à funcionária Márcia Sousa Silva.

À Médica Veterinária Camila Calheira da Silva Primo, proprietária da Clínica Veterinária Saúde Animal, e ao seu auxiliar Pablo Ricardo Santos Medrado.

À Profa. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima e à Médica Veterinária Nara Araújo Nascimento da Universidade Federal da Bahia.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, principalmente ao Francisco Oliveira de Magalhães Júnior e à Paula Elisa Brandão Guedes.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié, em especial à doutoranda Jamille Araújo Bitencourt.

Aos proprietários e aos seus animais.

Ao Roberto Vaz Penna Massler.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

TUMOR DE MAMA CANINO: ABORDAGEM CITOGENÉTICA.

RESUMO

As neoplasias de glândula mamária são os cânceres mais comuns em caninos, atingindo principalmente fêmeas em idade avançada. Devido às semelhanças entre diversas doenças, tais como o câncer, em cães e humanos, a espécie canina vem sendo utilizada como modelo de estudo para tais patologias. Na busca de melhor entendimento do comportamento das neoplasias tanto em caninos como humanos, a análise citogenética representa uma ferramenta auxiliar. Neste contexto, estudos citogenéticos de tumores mamários em fêmeas caninas foram realizados. Dez fêmeas caninas com ocorrência espontânea de neoplasia foram utilizadas para testar o protocolo de preparação direta para obtenção de cromossomos mitóticos o qual foi comparada com análise citogenética dos linfócitos periféricos. A metodologia testada permitiu concluir que a utilização desta técnica favorece o estudo da citogenética de tumores em cães por ser rápida e barata, mas depende ainda de mais ajustes para o melhor espalhamento dos cromossomos (capítulo 1). Em uma segunda etapa, três fêmeas caninas com ocorrência espontânea de carcinoma mamário foram selecionadas para coleta de sangue periférico e de tecido tumoral mamário, entre eles, um carcinoma em tumor misto. Foi observada a manutenção do número modal padrão da espécie ($2n=78$), tanto nas células dos linfócitos periféricos quanto neoplásicas. No entanto, 22,6% das metáfases das células do tumor apresentaram números diplóides superiores, variando de $2n=79$ a $2n=81$. Também foram observadas alterações estruturais nas análises realizadas nos cromossomos em metáfases de células tumorais (capítulo 2). No relato de um caso de carcinosarcoma mamário canino (capítulo 3) em uma fêmea da raça Poodle de 14 anos, a análise citogenética revelou alterações mais acentuadas que as descritas para os carcinomas. Oitenta por cento das células do tecido neoplásico demonstraram hipertriploidia (118 a 136 cromossomos) e, entre as aneuploidias identificadas, foram observadas a trissomia do par 1 e do cromossomo X de forma evidente, eventos semelhantes aos descritos na espécie humana. Estes dados comprovam que o aumento dos estudos sobre citogenética das neoplasias caninas pode trazer os benefícios ao diagnóstico da neoplasia e dos efeitos dessa patologia sobre o genoma para ambas as espécies.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas. Canino. Citogenética. Neoplasia mamária.

BREAST CANCER IN DOGS: A CYTOGENETIC APPROACH.

ABSTRACT

Breast gland tumors are the commonest cancers in dogs, affecting mainly females in old age. Due to the similarities between various diseases, such as cancer, between canines and humans, dogs have been used as a model to study such diseases. Cytogenetic analyses represent an auxiliary tool to achieve a better understanding about the behavior of tumors in both canine and humans. Therefore, cytogenetic studies of mammary tumors in female dogs were performed. Ten female dogs with spontaneous occurrence of cancer were used to test a direct preparation protocol for obtaining mitotic chromosomes which was compared to cytogenetic analyses of peripheral lymphocytes. This methodology showed that this technique is helpful to cytogenetics of tumors in dogs once it is quick and cost-saving, but it still depends on further adjustment for better chromosomal spreading (chapter 1). In a second step, three female dogs with spontaneous mammary carcinomas, including a mixed carcinoma, were selected for sampling of peripheral blood and tumor tissues. The standard modal number of species ($2n=78$) was maintained both in peripheral lymphocyte and tumoral cells. However, 22.6% of metaphases from tumor cells presented higher diploid numbers ranging from $2n=79$ to $2n=81$. Structural rearrangements were also observed on chromosomes from tumor cells (chapter 2). In a case report of mammary carcinosarcoma (Chapter 3) in a 14-year-old female Poodle, cytogenetic analyses revealed more pronounced changes than those described for carcinomas. Eighty percent of the cells in the tumor tissue showed hipertriploidy (118-136 chromosomes) and aneuploidy, mainly related to trisomy of pair 1 and X chromosome, similarly to the events reported in humans. These data demonstrate that as cytogenetic studies of canine tumors increase, further benefits to the diagnosis of cancer and the effects of this disease on the genome for both species might be accomplished.

Keywords: Chromosomal alterations. Canino. Cytogenetics. Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Cadela com TMC (A) e cadela com TMC ulcerado (B).....	17
Figura 02: Ideograma do cariótipo canino com 460 bandas de alta resolução, os cromossomos foram numerados de acordo com as recomendações do Comitê Internacional para Padronização do Cariótipo Canino.....	34
Capítulo I: PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DIRETA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS A PARTIR DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.	
Figura 01: Metáfases obtidas pela preparação direta de TMC: (a) Adenoma túbulo-papilar e adenoma papilar (2n=80); (b) carcinoma papilar ductal e carcinoma papilar (2n=77); (c) carcinosarcoma (2n=129).....	45
Capítulo II: ESTUDO CITOGENÉTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CÃES.	
Figura 01: Cariótipo de linfócitos periféricos (A) com 2n=78 e metáfases do carcinoma complexo do indivíduo 1 com 2n=75 (B), 2n=77 (C), 2n=78 (D), 2n=77 (E) e 2n=80 (F). Notar o tamanho do primeiro par cromossômico nas células tumorais (indicado por asteriscos).....	56
Figura 02: Cariótipo de linfócitos periféricos (A) com 2n=78 e metáfases do carcinoma em tumor misto do indivíduo 5 com 2n=80 (B) e 2n=78 (C). O pequeno cromossomo metacêntrico extra está indicado pelos asteriscos em B e C.....	57
Figura 03: Cariótipo de linfócitos periféricos (A) com 2n=78 e metáfases do carcinoma papilar do indivíduo 8 com 2n=78 (B) e 2n=80 (C). Os cromossomos X submetacêntricos podem ser identificados em B	57
Capítulo III: ESTUDO DE CASO: ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE UM CARCINOSSARCOMA MAMÁRIO CANINO.	
Figura 01: Cadela poodle, 14 anos de idade com carcinosarcoma mamário canino (A) e foto ampliada do tumor (B).....	61
Figura 02: Cariótipo de linfócitos periféricos (A) com 2n=78 e metáfases do carcinosarcoma mamário com 2n=128 (B) e 2n=129 (C).....	64
Figura 03: Cariograma de metáfases do carcinosarcoma mamário com 2n=130 (A), 2n=134 (B) e 2n=137 (C).....	
Figura 04: Metáfases de células linfocitárias (A) e de carcinosarcoma	64

mamário (B) após bandamento C.....	68
Figura 05: Metáfases de células linfocitárias normais (A) e de carcinossarcoma mamário (B) após coloração com fluorocromos base-específicos. Os sinais verdes indicam as regiões ricas em GC (CMA ₃ ⁺).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação Histológica de TMC (OMS, 1999).....	25
Capítulo I: PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DIRETA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS A PARTIR DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.	
Tabela 01: Classificação histológica das amostras de TMC e número de células metafásicas por amostra das preparações citogenéticas.....	42
Capítulo II: ESTUDO CITOGENÉTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CÃES.	
Tabela 01: Dados dos indivíduos, tipo histológico do tumor e índice mitótico das amostras de carcinomas mamários e dos linfócitos periféricos.....	51
Tabela 02: Números diploides encontrados nas células de linfócitos periféricos de cães portadores de carcinomas mamários.....	52
Tabela 03: Números diploides encontrados nas células neoplásicas de carcinoma mamário canino.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Tumor de mama canino (TMC)	16
2.1.1	Etiologia	18
2.1.2	Fatores predisponentes	20
2.1.3	Sinais clínicos	22
2.1.4	Diagnóstico	22
2.1.5	Classificação histológica TMC	24
2.1.6	Tratamento	25
2.1.7	Prognóstico	26
2.2	Análise citogenética	28
2.2.1	Citogenética canina	31
3	OBJETIVO	35
4	CAPÍTULO I	36
4.1	INTRODUÇÃO	37
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.2.1	Animais	39
4.2.2	Coleta e análise anátomo-histopatológica	39
4.2.3	Coleta e análise citogenética do tumor	49
4.2.4	Obtenção de cromossomos mitóticos das células tumorais	40
4.2.5	Preparo das lâminas para coloração	41
4.2.6	Técnica de coloração convencional	41
4.2.7	Análise das metáfases	41
4.3	RESULTADOS	41
4.4	DISCUSSÃO	43
4.5	CONCLUSÃO	46
5	CAPÍTULO II	47
5.1	INTRODUÇÃO	48
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	49
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.4	CONCLUSÃO	55

6	CAPÍTULO III	58
6.1	INTRODUÇÃO	59
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	60
6.2.1	Técnica de bandamento C	62
6.2.2	Técnica de tripla coloração (CMA ₃ / DA/ DAPI)	62
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.4	CONCLUSÃO	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
9	APÊNDICE	76
10	ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

Até os dias atuais, o grande interesse em estudos citogenéticos de tumores em humanos permitiu a listagem de mais de 62 000 cariótipos de neoplasias em um banco de dados virtual (MITELMAN DATABASE OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND GENE FUSIONS IN CANCER, 2013). Por outro lado, os estudos em citogenética de tumores caninos ainda são raros e carecem de análises refinadas.

Via de regra, tal carência de dados em caninos é justificada pelo cariótipo simétrico e com grande número de cromossomos da espécie (BREEN *et al.*, 2001). Além disso, a necessidade de equipamentos especializados e difícil padronização e alto custo das técnicas de cultura celular para obtenção de cromossomos mitóticos tornam-se empecilhos à ampliação dos dados de citogenética de tumores caninos.

Atualmente, não é apenas a relação de animal de companhia ou de trabalho que permeia a interação entre o homem e o cão. Após o sequenciamento do genoma canino em 2005 (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), descobriu-se também que muitas características genéticas são compartilhadas entre estas duas espécies. Devido às semelhanças entre diversas doenças genéticas em cães e humanos, a espécie canina é utilizada como modelo de estudo para tais patologias, inclusive para vários tipos de câncer (AIRLEY, 2012).

É possível, então, inferir que os estudos cromossômicos em células tumorais de cães conduzam à melhor caracterização das neoplasias e auxiliem no diagnóstico, tratamento e profilaxia dos tumores de mama tanto em cães quanto em humanos. No Brasil, essa abordagem é ainda pouco explorada, de tal modo que trabalhos básicos de padronização de metodologias, coleta e análise da diversidade citogenética tumoral devam ser realizados. Nesse sentido, a alta incidência de tumores mamários em fêmeas caninas faz dessas neoplasias um excelente modelo para o desenvolvimento desses estudos.

Na presente dissertação, foi testado um novo e rápido protocolo de preparação direta para obtenção de cromossomos mitóticos a partir de tumores mamários caninos, além de dois estudos de casos, envolvendo carcinoma mamário e carcinosarcoma mamário em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor de mama canino (TMC)

As neoplasias são doenças de origem genética provocadas por dano ao genoma celular. Caracterizam-se por mutações acumuladas não letais às células, induzindo-as à proliferação descontrolada. Células de um tecido hígido acometidas por alterações em um pequeno subconjunto do seu genoma tornam-se refratárias ao controle do ciclo celular. A multiplicação exacerbada leva a alterações na composição morfológica do tecido e pode desencadear processo infiltrativo além de seus limites anatômicos (CULLEN *et al.*, 2002; KUSEWITT; RUSH, 2007).

Os cães podem desenvolver vários tipos de neoplasias, sendo que as neoplasias mamárias (Figura 01) são a segunda em frequência, sobrepujadas apenas pelas cutâneas (BENJAMIN *et al.*, 1999; MOULTON, 1990). No caso das fêmeas, a neoplasia mamária é a mais comum e responsável por aproximadamente 50% dos casos de câncer (DALECK *et al.*, 1998; DE NARDI *et al.*, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002a,b). Os tumores mamários são formações neoplásicas com características bastante variáveis em relação ao número, tamanho, consistência, mobilidade e origem histológica (MISDORP *et al.*, 1999).

Segundo ZUCCARI *et al.* (2002), a diversidade morfológica dos tecidos tumorais mamários advém da formação histológica da glândula mamária, que dá origem a um tecido com população celular bastante variada. Esta população contempla, em estreita associação, a presença de células epiteliais de revestimento, chamadas de luminais e basais, além de fibroblastos e células adiposas, responsáveis pela sustentação do tecido mamário. Desta forma, o tecido mamário é composto por células de origem epitelial e mesenquimal, permitindo que os tumores sejam formados por um ou outro tipo tecidual ou ainda por ambos (MISDORP, 2002).

Cabe ressaltar a grande importância desta constituição morfológica nos estudos de tumores mamários, pois há uma relação direta entre a constituição do tumor e o seu prognóstico. Embora um animal possa apresentar tumores com mais de um tipo histológico ou diferentes tipos histológicos em um mesmo tumor, aquele com pior prognóstico é o que irá determinar a evolução clínica do

paciente (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; MISDORP, 1999; ZUCCARI *et al.*, 2001).

Dados epidemiológicos sobre a incidência de neoplasias mamárias benignas e malignas ainda são bastante conflitantes. Estudos baseados em dados a partir de exames encaminhados à análise histopatológica podem ser tendenciosos. O diagnóstico tardio pode levar neoplasias benignas a evoluírem para malignidade, e a falta de atenção clínica dada a algumas formações tumorais pequenas, inclusive não as encaminhando à análise histopatológica, pode alterar a proporção destas ocorrências (HELLMEN, 1993; MISDORP, 2002; OLIVEIRA, 2003; PELETEIRO, 1994).

Ainda assim, alguns autores relatam frequências similares para tumores benignos e malignos, estimados em cerca de 50% dos casos (DALECK *et al.*, 1998; HELLMEN, 2005; MISDORP, 2002; WITHROW; MACWEN, 1996). Misdorp (2002) relata que próximo de 30% dos tumores mamários removidos cirurgicamente são malignos. No entanto, Hellmen *et al.* (1993), em trabalho utilizando 223 cães, observou a ocorrência de 30% de tumores benignos, 68% de malignos e 2% de displasias, valores próximos aos encontrados para os tumores malignos por DE NARDI *et al.* (2002), LORENZOVÁ *et al.* (2010) e OLIVEIRA *et al.* (2003). Por outro lado, Allen *et al.* (1986) avaliou 75 glândulas mamárias de 33 animais, diagnosticando as formações como 44% benignas, 48% malignas e 8% hiperplasias. O uso de diferentes critérios entre patologistas no diagnóstico de TMC permite que a proporção de tumores malignos varie de 26 a 73% de acordo com diferentes estudos (PEREZ ALLENZA, 2000).

Benjamin *et al.* (1999), em estudo com 1343 Beagles, 671 machos e 672 fêmeas, submetidos a baixo nível de radiação gama, descreveram 65% dos casos como benignos, sendo que apenas 2 cães machos apresentaram a neoplasia. Também relatou que a incidência dos tumores malignos e benignos foi a mesma para o grupo testado e o controle, sugerindo apenas que a radiação deve mudar um pouco o padrão de malignidade.

2.1.1 Etiologia

As causas das neoplasias de mama canina ainda não estão bem esclarecidas e muitos fatores são associados ao seu desenvolvimento, caracterizando-as como uma alteração multifatorial (OLIVEIRA *et al.*, 2003;

PAWLOWSKI *et al.*, 2009; PEREZ ALLENZA *et al.*, 2000). No entanto, fatores genéticos e hormonais estão entre os mais associados ao processo desencadeador da moléstia (CULLEN *et al.*, 2002; LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002).

A replicação descontroladas das células no TMC é resultante da alteração da expressão ou perda de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular. O oncogene c-erbB2, responsável pela expressão de receptores para fatores de crescimento, e o gene p53, associado à supressão da proliferação celular são os principais genes envolvidos no processo de carcinogênese mamária (CULLEN *et al.*, 2002; MISDORP, 2002; SILVA, *et al.*, 2004; VIDALES; MOCHA, 2007).

Em um estudo com tumores mamários malignos em cães, o oncogene c-erbB2 apresentou aumento da expressão na maioria dos casos, porém sem associação com a invasão vascular ou metástases regionais. No entanto, em estudo de sete linhagens celulares de TMC, apenas duas apresentaram expressão estável de c-erbB2 e não estavam associadas com progressão da neoplasia durante o período de cultura das linhagens (MISDORP, 2002). Também foi observado, em outra pesquisa, o aumento da proteína codificada pelo oncogene c-erbB2 em 74% de tumores e linhagens celulares derivadas de neoplasia mamária canina, porém este evento não foi observado em tumores de mama canino benignos (CULLEN *et al.*, 2002).

Mutações no gene p53 têm sido detectadas em vários tipos de tumores caninos, como carcinomas de tireoide, osteossarcomas e tumores de mama. A perda de um alelo e mutação no seu homólogo foi observada em três de nove linhagens celulares de tumor de mama canino, conduzindo à perda da total da característica “selvagem” deste alelo. Ainda em relação a estas três linhagens, foram observados pontos de mutação idênticos em duas destas, mas sem alteração no tecido hígado (MISDORP, 2002).

Quanto ao envolvimento dos fatores hormonais, há possibilidade de que os hormônios esteroides possam atuar como agentes da carcinogênese do TMC como iniciadores (estímulo à proliferação celular) ou promotores (determinação de mutações no genoma). Embora os hormônios isoladamente não sejam capazes de desencadear um quadro neoplásico, a ação sinérgica com outros fatores em determinados estágios da progressão tumoral podem desempenhar função determinante (PELETEIRO, 1994; SILVA, 2004).

O desenvolvimento de tumores mamários em cães é reconhecidamente hormônio-dependente. É observada a presença de receptor para estrógeno (ER), progesterona (PR), prolactina (PRL-R) e fator de crescimento epidermal (EGF-R) em glândulas mamárias de fêmeas caninas afetadas e não afetadas por TMC, podendo haver coexistência destes receptores em uma mesma neoplasia. O papel dos hormônios ovarianos, especialmente da progesterona, está associado à atividade mitogênica provocada pela ligação destes aos seus respectivos receptores (FONSECA; DALECK, 2000; LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002; SILVA, 2004).

A existência de TMC com ER, PR ou apenas ER indicam um melhor prognóstico, pois os ER tem maior relação com a ocorrência de tumores bem diferenciados, enquanto a presença exclusiva de PRs está associada a tumores indiferenciados e progressão da patologia. Além disso, é frequente a observação de ERs e PRs em TMC benignos, enquanto apenas alguns TMC malignos manifestam estes receptores, geralmente em baixas concentrações. Portanto, o avanço da doença deve promover perda da dependência hormonal, demonstrando que em TMC malignos a expressão de genes que codificam os receptores é diminuída ou totalmente perdida (FONSECA; DALECK, 2000; LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002; SILVA, 2004).

2.1.2 Fatores predisponentes

Como citado anteriormente, a neoplasia mamária canina é reconhecida como um evento de origem multifatorial, sendo que diversos fatores são estudados no intuito de correlacioná-los com a predisposição de ocorrência da doença. Entre eles, os mais citados na literatura são a influência do sexo, idade, raça, OSH, obesidade e o uso de anticoncepcionais nas fêmeas caninas.

Vários estudos confirmam as fêmeas caninas como mais predispostas ao acometimento de TMC (BENJAMIN *et al.*, 1999; DE NARDI, 2002; EGENVALL, 2005; LANA *et al.*, 2007; MOULTON, 1990; OLIVEIRA FILHO, 2010; RICHARDS *et al.* 2001), enquanto machos raramente apresentam esta alteração (BENJAMIN *et al.*, 1999; MITCHELL, 1974; RUTTEMAN *et al.*, 2001), quadro que está geralmente relacionado à ocorrência de hiperestrogenismo, devido ao sertolioma (MEUTEN, 2002).

Quanto à idade, animais maduros e idosos são mais acometidos pelas neoplasias do que animais jovens (BENJAMIN *et al.*, 1999; DE NARDI, 2002; HELLMEN, 1993; LANA *et al.*, 2007; OLIVEIRA FILHO, 2010; RICHARDS *et al.*, 2001). LORENZOVÁ *et al.* (2010) relatam que a média de idade das fêmeas acometidas por TMC maligno é de 10,1 anos, as com TMC benigno é de 8,9 anos e as com hiperplasias mamárias de 8,5 anos.

Há controvérsia quanto à influência racial como fator predisponente à ocorrência de TMC, principalmente devido à variação na composição das populações utilizadas nos experimentos (OLIVEIRA FILHO, 2010; PEREZ ALLENZA *et al.*, 2000; VIDALES; MOCHA, 2007). Apesar disto, alguns estudos indicam cães da raça Boxer e Chihuahuas com menor predisposição ao desenvolvimento do TMC quando comparados a cães de caça. Igualmente, os cães sem raça definida seriam menos predispostos que os cães de raça pura (PEREZ ALLENZA *et al.*, 2000). Por outro lado, Daleck *et al.*, (1998) e Peleteiro (1994) afirmam que não há influência racial na ocorrência de TMC.

Apenas animais castrados antes dos dois anos e meio de idade, ou antes do 3º ciclo estral, se beneficiam com o efeito protetor da OSH (FONSECA; DALECK, 2000), uma vez que a OSH realizada antes do 1º ciclo estral reduz a chance de desenvolvimento de TMC a 0,5%. Após o 1º ciclo, este valor aumenta para 8% e após o 2º ciclo estral estima-se redução probabilística em 26% (RUTTEMAN *et al.*, 2001). Apesar de ser frequente a realização simultânea de OSH e remoção de neoplasias mamárias (OLIVEIRA FILHO, 2010), não há indicação de que a OSH tenha efeito protetor sobre o aparecimento de novos tumores, desenvolvimento de metástases ou aumento de expectativa de vida do paciente.

O papel da nutrição na carcinogênese do TMC está intimamente ligado à ocorrência de obesidade nos animais nos primeiros meses de vida (PELETEIRO, 1994; PEREZ ALLENZA *et al.*, 2000). Misdorp (2002) cita como exemplo a possibilidade dos fatores nutricionais nos animais jovens alterarem a concentração e disponibilidade dos hormônios sexuais femininos.

Por fim, o uso de anticoncepcionais em cadelas para prevenção de estros e tratamento de pseudociese aumenta o risco de aparecimento de TMC (DE NARDI *et al.* 2002; PEREZ ALLENZA *et al.*, 2000). Isso é particularmente evidente para nódulos benignos, embora o uso frequente possa conduzir ao desenvolvimento de tumores malignos (LANA *et al.*, 2007).

2.1.3 Sinais clínicos

A maioria das fêmeas caninas possui 5 pares de glândulas mamárias, dispostas bilateralmente desde a região torácica ventral até a inguinal e denominadas torácica cranial, torácica caudal, abdominal cranial, abdominal caudal e inguinais. As glândulas abdominal caudal e inguinais são mais frequentemente acometidas por TMC que as demais, provavelmente pela maior quantidade de tecido mamário presente (CASSALI *et al.* 2011; MITCHELL, 1974).

Os TMC apresentam-se geralmente como nódulos delimitados, mas podem ser massas de formato irregular. Eles podem ser únicos ou múltiplos, presentes em uma ou mais glândulas, flutuantes ou aderidos à pele ou ao tecido muscular e com consistência macia ou firme. Além de tipos histológicos diferenciados em alguns casos, os TMC também podem estar associados à ulceração ou à inflamação (LANA *et al.*, 2007; PEREZ ALLENZA, 1997; QUEIROGA; LOPES, 2002).

É comum que os animais se encontrem clinicamente saudáveis na ocasião do diagnóstico de TMC. Nesses casos, a descoberta pode ser feita pelo proprietário ou pelo veterinário durante exame físico de rotina (CASSALI *et al.*, 2011). A distinção clínica entre neoplasia benigna e maligna não é possível, embora sinais como rápido crescimento tumoral, tamanho, ulceração e aderência à pele ou aos tecidos próximos sejam indicativos do processo de malignidade (LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002).

De todos os TMC, o carcinoma inflamatório é o único que apresenta sinais clínicos sistêmicos característicos de processo inflamatório e, portanto, frequentemente a característica tumoral não se torna evidente. Desta forma, é comum que os sinais clínicos sejam confundidos com mastite, abscesso mamário ou dermatite, prejudicando substancialmente o diagnóstico desta neoplasia (GOMES *et al.*, 2006; SÁ; REPETTI, 2011).

2.1.4 Diagnóstico

A avaliação de animais acometidos por TMC deve constar de anamnese e exame físico minuciosos, além de exames laboratoriais e de imagem, pois é o conjunto destas informações que irá definir o diagnóstico, tratamento e prognóstico da patologia (DE NARDI, 2002). No caso dos tumores malignos, também são os dados obtidos através de avaliação detalhada que permitem

determinar o estadiamento da neoplasia, o qual permite indicar a extensão do crescimento tumoral e sua disseminação (PEREZ ALENZA *et al.*, 1997; QUEIROGA; LOPES, 2002).

A existência de fatores predisponentes à ocorrência de TMC deve orientar a investigação da anamnese. Portanto, a identificação do animal (idade, sexo e raça), condição reprodutiva (ciclo estral regular, número de parições, abortos, castração, uso de anticoncepcionais e pseudociese), histórico médico, dieta, data aproximada do aparecimento do primeiro nódulo mamário e possíveis lesões tumorais anteriores são dados a serem coletados pelo profissional (CASSALI *et al.*, 2011; DE NARDI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

O exame clínico deve constar de avaliação das cadeias mamárias e dos linfonodos regionais, além das características gerais que indicam o estado físico do animal. Os aspectos referentes a número, tamanho, consistência, mobilidade, aderência aos tecidos adjacentes e ulceração dos nódulos são critérios importantes durante a avaliação clínica. Os linfonodos axilares e inguinais devem ser examinados quanto ao tamanho, forma e consistência, pois alterações destas características estão associadas à ocorrência de metástases (LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002).

Segundo Peleteiro (1994), os órgãos mais afetados por metástases de TMC são o pulmão e os linfonodos, sendo que os rins, o fígado, o baço, a pele, o encéfalo e o esqueleto também podem ser acometidos. São necessárias radiografias do pulmão em três posições (ventro-dorsal, latero-lateral direita e esquerda) para avaliação de metástases, sendo que a ausência de lesões típicas não excluem a possibilidade de micro metástases e agravamento futuro da neoplasia.

Apesar de a histopatologia ser o método diagnóstico de eleição para TMC, a utilização de citologia aspirativa por agulha fina (CAAF) tem demonstrado características vantajosas como método auxiliar diagnóstico (DALECK *et al.*, 1998). A CAAF pode fazer diagnóstico diferencial com outros tipos de tumores que podem acometer a região das glândulas mamárias, tais como lipomas, linfossarcomas e mastocitomas. É recomendada por ser um exame rápido, barato e seguro, pois induz injúria tecidual mínima, não requer uso de anestesia e produz resultados confiáveis na maioria das vezes (ZUCCARI, 2001). Também, na avaliação dos linfonodos regionais para

identificação de metástases sugere-se o uso da CAAF (LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002).

Por outro lado, o exame histopatológico analisa a estrutura tecidual em sua totalidade, pois a arquitetura do tecido está preservada. Desta forma, a histopatologia permite identificar: o tipo e a forma de crescimento do tumor (intraductal, infiltrativo ou invasivo); o grau de infiltração nos tecidos e vasos adjacentes; a histomorfologia tumoral (presença ou ausência de pleomorfismo ou necrose, grau de diferenciação, índice mitótico); e a presença de margens cirúrgicas livres de células neoplásicas (MISDORP, 1999).

A técnica de coloração de rotina utilizada em histopatologia é a coloração por hematoxilina e eosina (HE). No entanto, o uso de técnicas especiais, tal como a imunohistoquímica, pode auxiliar no diagnóstico de alguns tipos tumorais. A identificação de filamentos intermediários em tecidos tumorais utilizando-se a imunohistoquímica pode fornecer informações sobre a histogênese das células neoplásicas. Nesse caso, a marcação positiva para citoqueratina indica origem epitelial e marcação positiva para vimentina indica origem mesenquimal (KUSEWITT; RUSH, 2007; ZUCCARI *et al.*, 2002).

2.1.5 Classificação histológica TMC

Muitos sistemas de classificação histológica dos TMC têm sido propostos baseados em diferentes fundamentações, dificultando a comparação de resultados entre diversos autores (BENJAMIN *et al.*, 1999; CASSALI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PEREZ ALLENZA, 2000). Misdorp (2002) descreve três formas principais de classificação dos TMC segundo a utilização de critérios baseados em características histogenéticas, morfológicas descritivas ou prognósticas.

A classificação histológica da OMS-Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) (Tabela 01), proposta por Misdorp *et al.* (1999), é a mais amplamente aceita pelos patologistas. Esta classificação é baseada em critérios histológicos e morfológicos descritivos, além de considerar fatores relacionados ao prognóstico dos TMC (MISDORP *et al.*, 1999; MISDORP, 2002). Encontra-se dividida em quatro grandes grupos: tumores malignos, tumores benignos, tumores não classificados, e hiperplasias ou displasias mamárias, sendo que o primeiro grupo está organizado por ordem crescente de malignidade (MISDORP *et al.*, 1999).

Tabela 01: Classificação Histológica de TMC (OMS, 1999).

Tumores Malignos	
Carcinoma não infiltrativo (<i>in situ</i>)	
Carcinoma Complexo	
Carcinomas Simples	Carcinoma Tubulopapilar Carcinoma Sólido Carcinoma Anaplásico
Carcinomas de Tipos Especiais	Carcinoma de Células Fusiformes Carcinoma de Células Escamosas Carcinoma Mucinoso Carcinoma Rico em Lipídeos
Sarcoma	Fibrossarcoma Osteossarcoma Outros Sarcomas
Carcinossarcoma	
Carcinoma ou Sarcoma em Tumores Benignos	
Tumores Benignos	
Adenoma	Adenoma Simples Adenoma Complexo Adenoma Basalóide
Fibroadenoma	
Tumor Misto Benigno	
Papiloma Ductal	
Tumores não Classificados	
Displasias/ Hiperplasias Mamárias	
Hiperplasia Ductal	
Hiperplasia Lobular	Hiperplasia Epitelial Adenose
Cistos	
Ectasia Ductal	
Fibrose Focal (Fibroesclerose)	
Ginecomastia	

Adaptado de: Misdorp et al. (1999).

2.1.6 Tratamento

É recomendada a exérese das massas tumorais como método eletivo de tratamento dos TMC, exceto nos casos de carcinoma inflamatório ou presença de metástases à distância. O objetivo da remoção cirúrgica é eliminar completamente o tecido tumoral, mantendo as margens cirúrgicas livres de tecido neoplásico, o que pode permitir desde a cura completa do animal até a melhoria na qualidade e no tempo de sobrevivência do mesmo (LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002).

Várias técnicas cirúrgicas podem ser utilizadas para ressecção de TMC, sendo que os principais critérios adotados para escolha do procedimento são: tamanho do tumor, número de formações, aderência aos tecidos adjacentes, localização e avaliação dos linfonodos regionais (MISDORP, 2002). É possível realizar apenas a excisão do nódulo mamário (lumpectomia/nodulesctomia), de uma única glândula mamária (mastectomia simples), de duas ou mais glândulas mamárias (mastectomia regional), de uma cadeia mamária (mastectomia unilateral) ou até mesmo de ambas as cadeias mamárias (mastectomia bilateral). A retirada dos linfonodos regionais deve considerar a localização da glândula ou glândulas mamárias afetadas e o seu próprio acometimento.

Segundo Lana *et al.* (2007), não há indícios de que cirurgias mais invasivas resultem em melhores resultados pós-cirúrgicos do que cirurgias conservadoras, pois nenhuma diferença na taxa de recorrência da neoplasia mamária e tempo de sobrevida do paciente pode ser observada entre a mastectomia simples e a mastectomia radical. Portanto, não é a técnica cirúrgica empregada, mas a remoção total da massa tumoral, que garante o melhor prognóstico.

Outros tipos de tratamento podem ser indicados como terapia auxiliar em casos de tumores inoperáveis, malignos, com presença de metástases ou casos de recidiva, tais como: quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. De acordo com De Nardi *et al.* (2002), a quimioterapia associada à cirurgia com ampla margem de segurança pode ser utilizada para prolongar a sobrevida do animal acometido por TMC. Entretanto, outros autores sugerem a necessidade de mais estudos a fim de se comprovar a eficácia da quimioterapia, da radioterapia e hormonioterapia no tratamento de neoplasias mamárias (LANA *et al.*, 2007; MISDORP, 2002; SILVA *et al.*, 2004).

2.1.7 Prognóstico

A definição de fator prognóstico relaciona-se a uma ou mais características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos envolvidas com a evolução clínica e a sobrevivência do paciente na ausência de terapias adjuvantes após a cirurgia. No entanto, o uso de fatores preditivos está condicionado a tratamentos específicos e individualizados (CASSALI *et al.*, 2011).

Perez Allenza *et al.* (2000) citam que o conhecimento destes fatores é importante porque permite estabelecer um prognóstico inicial e tratamento adequado do paciente. Também, a avaliação pós-cirúrgica é igualmente relevante, considerando que parâmetros clínicos e patológicos também podem ser utilizados como predição de potencial ocorrência de recidivas e/ou metástases.

Lorenzová *et al.* (2010) analisaram a sobrevida e a causa de mortalidade de 221 fêmeas caninas após remoção cirúrgica de TMC considerando o tipo histológico do tumor segundo a classificação da OMS. O período de sobrevida foi menor para os animais acometidos por carcinomas sólidos e complexos do que os afetados com os demais tipos histológicos. Ainda, animais com adenoma obtiveram maior tempo de vida enquanto o melhor prognóstico foi associado aos pacientes com tumores benignos e carcinomas tubulares não invasivos. Contudo a causa da morte nesse estudo não foi associada com TMC.

O sistema de estadiamento clínico dos TMC, estabelecido pela OMS, tem por objetivo auxiliar no planejamento do tratamento e fornecer indicações prognósticas. Ele está baseado na avaliação de três parâmetros: tamanho do tumor primário, ausência ou presença de metástases nos linfonodos regionais e/ou distância. Com o mesmo intuito, há o esquema de classificação do grau histológico de malignidade das neoplasias mamárias, o qual avalia índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica (LANA *et al.*, 2007; MISDORP *et al.* 1999, 2002).

Além das formas de avaliação prognóstica baseadas nos aspectos clínico-patológicos tem se utilizado novas características para predizer o comportamento dos TMC. Queiroga e Lopes (2002) avaliaram o índice proliferativo medido pelo PCNA e densidade de micro-vascularização medida pelo CD31 como potenciais fatores prognósticos; Queiroga *et al.* (2005) indicam que um pior prognóstico está associado a altos níveis de ciclooxigenase-2 (COX-2) intratumoral. Como os TMC têm apresentado incidência crescente e complexa variabilidade clínica, o incremento no estudo de marcadores prognósticos e sua padronização podem permitir seu uso como fatores prognósticos independentes (CASSALI *et al.*, 2011).

2.2 Análise citogenética

A citogenética é a área que pesquisa os cromossomos, estruturas responsáveis por conservar, transmitir e expressar toda a informação genética de um organismo no que se refere a sua morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução (GUERRA, 1988). O conjunto cromossômico de um indivíduo ou de uma célula, ordenado em pares de homólogos mais os cromossomos sexuais, incluindo suas características de número, tamanho e morfologia, chama-se cariótipo (ALBERTS, 2002).

Os cromossomos apresentam-se com melhor visualização ao microscópio óptico durante a metáfase, etapa da meiose ou mitose nas quais os cromossomos estão completamente espiralados e são formados por duas cromátides, devido à duplicação do DNA ocorrida na fase S do ciclo celular (HARE *et al.*, 1966; KASAHARA, 2009). No caso de mamíferos, os cromossomos metafásicos mitóticos permitem uma melhor análise cariotípica devido seu alto grau de condensação e espalhamento, favorecendo a contagem do número diploide, a definição de morfologia e a identificação dos cromossomos sexuais (GUERRA; SOUZA, 2002).

Os estudos citogenéticos podem se basear na análise cariotípica de uma espécie (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), de populações (THOMAS *et al.*, 2009), de indivíduos (WINKLER *et al.*, 2006) ou de tecidos (PATEL, 2012). Vários tecidos ou órgãos podem ser utilizados na preparação de suspensões citológicas para estudos citogenéticos, dependendo da facilidade de obtenção ou especificidade do tecido estudado. A literatura cita entre eles: sangue periférico, medula óssea, baço, pele, fáscia, pulmão, fígado, rim, testículo, córnea e tumores sólidos (HARE *et al.*, 1966).

A obtenção de cromossomos mitóticos pode ser realizada através de métodos de preparação direta ou cultura de células de curto ou longo prazo (HARE *et al.*, 1966; KASAHARA, 2009). No entanto, as etapas de colchicinação, hipotonização e fixação são necessárias a ambos os métodos durante a preparação das suspensões celulares a fim de que elas apresentem boa qualidade. A solução de colchicina tem por objetivo o bloqueio temporário da divisão celular durante a metáfase, a solução hipotônica provoca turgidez da célula e melhor espalhamento dos cromossomos e a fixação permite a remoção de resíduos celulares da suspensão (KASAHARA, 2009).

A técnica de preparação direta caracteriza-se pela observação das células ativamente em divisão no tecido como no momento da coleta. É um método frequentemente utilizado em diversos estudos citogenéticos, como no caso de insetos (WEBB *et al.*, 1978), peixes (NETTO *et al.*, 2007), anfíbios (BOGART, 1973), répteis (KING; ROFE, 1976), aves (SHOFFNER *et al.*, 1967) e pequenos mamíferos (FORD; HARMERTON, 1956). Suas vantagens incluem praticidade, rapidez e baixo custo. A cultura de curto prazo é utilizada principalmente quando o material é proveniente de sangue periférico, enquanto a cultura de longo prazo é utilizada para materiais obtidos através de biópsia de tecido sólido (KASAHARA, 2009).

A coloração convencional dos cromossomos mitóticos de vertebrados é rotineiramente realizada utilizando-se o corante Giemsa. Esta técnica é simples, rápida e permite submeter o material corado a outras técnicas citogenéticas sequencialmente. Contudo, a coloração convencional com Giemsa promove apenas uma caracterização macrocariotípica, identificando alterações cromossômicas evidentes, como constrições secundárias em um ou mais cromossomos, presença de satélites, quebras eventuais, falhas cromatídicas, cromossomos marcadores do tipo puntiforme, par heteromórfico sexual ou autossômico, ocorrência de cromossomos B, alterações numéricas e certos tipos de rearranjos estruturais (GUERRA; SOUZA, 2002; KASAHARA, 2009).

Outras técnicas que definem “bandas” são empregadas para identificação e análise da microestrutura dos cromossomos, pois fornecem uma diferenciação longitudinal dos cromossomos e são chamadas de bandamentos cromossômicos (GUERRA; SOUZA, 2002; KASAHARA, 2009). O termo banda é definido como uma região do cromossomo claramente distinta do segmento adjacente por se apresentar como uma faixa transversal revelada por procedimentos especiais de coloração. As técnicas de bandamento cromossômico permitem que sejam visualizadas bandas distribuídas ao longo de todo o comprimento do cromossomo, como uma série contínua de bandas claras ou escuras, ou a observação de um número restrito de bandas específicas ou de estruturas do cromossomo (SUMNER, 2003).

Entre as técnicas de bandamento normalmente usadas nas análises citogenéticas de mamíferos destacam-se o bandamento C, G e Ag-RON. Inicialmente, estas técnicas foram utilizadas para realização do pareamento de

cromossomos, porém as técnicas também possibilitam compreender melhor as alterações cromossômicas que se estabelecem em cada cariótipo (GUERRA, 1998). Com os bandamentos, é possível identificar inversões paracêntricas, translocações recíprocas e/ou microdeleções (SUMNER, 2003).

A técnica de bandamento C consiste na despurinização da molécula de DNA pelo tratamento com solução ácida, posterior quebra nos sítios apurínicos durante o tratamento alcalino e extração de DNA durante incubação em solução salina aquecida, de acordo com as etapas descritas por Sumner (1972). As regiões de heterocromatina são mais resistentes a essa remoção e podem ser identificadas depois de coradas pela técnica convencional com Giemsa, gerando as bandas C. Assim, esse método permite identificar regiões de DNA altamente repetitivo (heterocromáticas), particularmente comuns ao redor dos centrômeros, de onde deriva o nome de bandamento C. Contudo as bandas C também podem ser visualizadas em regiões pericentroméricas, intersticiais, teloméricas, intercaladas às regiões organizadoras de nucléolos (RONs) ou em cromossomos sexuais e supranumerários (KASAHARA, 2009).

O bandamento G é a técnica mais utilizada para a identificação de pareamento cromossômico em mamíferos. O método frequentemente adotado para a realização da técnica é o instituído por Seabright (1971). Neste método, os cromossomos são submetidos a tratamento enzimático com tripsina e, posteriormente, corados pela coloração convencional, produzindo faixas transversais com regiões mais coradas do que outras, sendo que as mais coradas apresentam maior conteúdo de AT (KASAHARA, 2009). Nessa metodologia é possível comparar cariótipos de espécies relacionadas e identificar rearranjos estruturais sutis (SUMNER, 2003).

A técnica amplamente utilizada para a detecção das regiões organizadoras de nucléolos (RONs), que inclui o DNAr 45S, é a descrita por Howel e Black (1980). Nessa metodologia, os cromossomos são impregnados com solução de nitrato de prata e uma solução coloidal para corar as regiões onde se encontram os loci dos genes para RNA ribossômico (RNAr) pela precipitação preferencial de íons de prata. Porém, esse é um método indireto de mapeamento de genes ribossomais uma vez que as RONs apresentam afinidade pela prata apenas quando estão em atividade transcricional no momento imediatamente anterior à divisão celular (KASAHARA, 2009). Desse

modo, esse método parece ser mais adequado para avaliar a expressão de cístrons ribossomais (SUMNER, 2003).

A coloração por fluorocromos base-específicos é outra metodologia utilizada para a identificação de regiões repetitivas particulares, ricas em bases AT ou GC a depender do fluorocromo selecionado. Essa técnica é comumente empregada em vertebrados inferiores (anfíbios e peixes), nos quais os sinais fluorescentes atuam como marcadores citológicos na caracterização de cariótipos (SUMNER, 2003). Esta técnica é relevante para a determinação citológica da constituição molecular de regiões heterocromáticas. Por exemplo, a tríplice coloração com os fluorocromos CMA₃/DA/DAPI envolve, respectivamente, o emprego de corante primário com especificidade para bases GC, contracorante AT-específico e corante primário AT-específico (KASAHARA, 2009). Em mamíferos, essa metodologia é pouco usada até o momento.

2.2.1 Citogenética canina

Vários relatos descrevendo o padrão cariotípico de cães já foram publicados nos últimos 100 anos (Reimann *et al.*, 1999) com variações do número diploide entre 50 a 78 cromossomos. Em 1928, Minouchi, analisando células meióticas caninas identificou o número diploide do cão em 78 cromossomos (*apud* BREEN *et al.*, 2001). Este resultado foi confirmado por Gustavsson (1964), utilizando cultura de linfócitos de sangue periférico.

Com o advento de novas técnicas, como a hipotonização de células provenientes de cultura celular (HSU; POMERAT, 1953) e o uso combinado de colchicina e a técnica de esmagamento (TIJO; LEVAN, 1956), a citogenética de mamíferos passou por um grande avanço. Igualmente, essas metodologias permitiram determinar o número diploide de 78 cromossomos para a espécie *Canis familiaris* (GUSTAVSSON, 1964; HARE *et al.*, 1965).

Em cães, a utilização do método de coloração convencional (Giemsa) permite identificar de forma precisa apenas os cromossomos sexuais, uma vez que os cromossomos X e Y são metacêntricos e representam, respectivamente, o maior e o menor cromossomo do conjunto. Os demais autossomos apresentam a mesma morfologia (acrocêntricos) e decrescem gradualmente em tamanho. Desta forma, com exceção do primeiro par que constitui o maior dos autossomos, o reconhecimento inequívoco dos demais

pares de homólogos através da coloração convencional é improvável (BREEN *et al.*, 2001).

No início da década de 1970, os métodos de bandamento cromossômico, permitiram a possibilidade de identificação de pares de homólogos (BREEN *et al.*, 2001). Selden *et al.* (1975) foram os primeiros a publicarem uma descrição de padrão de banda G para cromossomos caninos. Neste relato, foi estabelecido um ideograma com 331 bandas por conjunto haploide. Em seguida, Manolache *et al.* (1976) apresentaram um ideograma com 230 bandas com um arranjo diferente dos cromossomos, utilizando a técnica de bandamento G. Além disso, estes autores descreveram os padrões das bandas Q e C do cariótipo canino. Fujinaga *et al.* (1989) foram os próximos a propor um ideograma para banda G de cromossomos caninos, seguindo o padrão definido por Manolache *et al.* (1976), sendo que o número de bandas G por conjunto haploide foi de 228 bandas.

Utilizando a técnica de sincronização de células e seguindo o modelo de arranjo dos cromossomos definido por Selden *et al.* (1975), Stone *et al.* (1991) apresentaram um ideograma com 327 bandas utilizando bandamento G. No entanto, Graphodatsky *et al.* (1995) publicaram um estudo que não seguiu o alinhamento dos cromossomos descrito em nenhum dos trabalhos anteriores, demonstrando a ocorrência de 460 bandas nos cromossomos caninos e suas características, através da técnica de bandamento G. Adicionalmente, os ideogramas para bandamento R foram repetidamente descritos, apresentando arranjos de cromossomos e números de bandas diferentes, de forma análoga ao ocorrido com as descrições de bandamento G (HOWARD-PEEBLES; PRIOR, 1980; MAYR *et al.*, 1986; MORENO-MILLAN *et al.* 1991; POULSEN *et al.*, 1990).

Em função dessas divergências, foi constituído um comitê durante o 11^o European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals (1994) para padronizar o cariótipo canino. Este grupo considerou que a maioria das citações sobre a caracterização do cariótipo canino era baseada nos estudos de Selden *et al.* (1975) e optaram por seguir este padrão no que fosse possível (REIMANN *et al.*, 1999). Os esforços resultaram na padronização de banda G dos primeiros 21 pares de autossomos e dos cromossomos sexuais (SWITONSKI *et al.*, 1996).

Adicionalmente, foi verificado que o desenvolvimento da padronização para todos os demais 17 pares autossômicos utilizando apenas a técnica de bandamento G seria impossível. Portanto, seria necessária a introdução de técnicas moleculares para a identificação dos menores autossomos, tais como a pintura cromossômica e o mapeamento físico de marcadores genéticos, para identificação inequívoca dos menores pares de homólogos (SWITONSKI *et al.*, 1996).

Langford *et al* (1996) desenvolveram a técnica de pintura cromossômica para cromossomos caninos, utilizando o método de citometria de fluxo, e propuseram que isto facilitaria a padronização do cariótipo, considerando que apenas os pares cromossômicos 1 ao 21 eram oficialmente normatizados.

Novamente, o Comitê para a Padronização do Cariótipo Canino foi indicado para avaliação dos 17 autossomos não padronizados. Durante essa segunda etapa, foram combinados estudos de bandamento, hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e pintura cromossômica, quando foi possível padronizar todos os 39 pares de cromossomos. Neste caso, para a identificação dos pares de cromossomos homólogos 22 a 38 foi adotado o padrão de arranjo descrito por Selden *et al.* (1975) e para a descrição de marcações cromossômicas características e número de bandas foi utilizado o ideograma adaptado de Reimann *et al.* (1996) (REIMANN *et al.*, 1999, 2012; SWITONSKI *et al.*, 1996).

Atualmente, a nomenclatura utilizada em estudos citogenéticos caninos adota os padrões definidos pelo Comitê de Padronização do Cariótipo Canino (Figura 03), porém, a nomenclatura para a descrição de alterações cromossômicas da espécie não se encontra estabelecida. Nestes casos, recomenda-se a utilização da ISCN (1995) como referência (REIMANN *et al.*, 1999).

3 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo analisar citogeneticamente tumores sólidos de glândulas mamárias em cães a partir de um protocolo modificado para obtenção direta de cromossomos mitóticos de células neoplásicas.

4. CAPÍTULO I

**PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DIRETA PARA OBTENÇÃO DE
CROMOSSOMOS MITÓTICOS A PARTIR DE TUMORES MAMÁRIOS
CANINOS.**

PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DIRETA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS A PARTIR DE TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

4.1 INTRODUÇÃO

O estudo citogenético de tumores caninos ainda é pouco explorado (BREEN *et al.*, 2001). Entretanto, as neoplasias representam um problema clínico importante, especialmente em função da maior longevidade desses animais com os avanços da medicina veterinária. Entre elas, destacam-se as neoplasias mamárias como principal processo oncológico canino devido sua elevada incidência (CASSALI *et al.*, 2011). Adicionalmente, após o sequenciamento do genoma canino (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), descobriu-se que muitas características genéticas dos cães são similares a dos humanos, tornando-os excelente modelos para estudos da base genética do câncer em humanos (ARLEY, 2012; KHANNA *et al.*, 2006).

Desta forma, há grande interesse na ampliação de trabalhos sobre as alterações cromossômicas que ocorrem nas células tumorais caninas, pois estes estudos podem oferecer benefícios a ambas as espécies (HARE *et al.*, 1966; REIMANN-BERG *et al.*, 2012). Neste sentido, a contribuição da citogenética para a identificação das alterações cromossômicas que estão associadas à ocorrência de tumores favorece o aprimoramento das técnicas diagnósticas e prognósticas (BREEN, 2008; DEVITT *et al.*, 2009; SARGAN *et al.*, 2005; SUMNER, 2003).

O passo inicial para realização de estudos cromossômicos é a obtenção de células em metáfase, pois durante esta fase do ciclo celular os cromossomos encontram-se individualizados e condensados, passíveis de visualização ao microscópio óptico. A suspensão celular pode ser obtida através de diferentes metodologias que têm em comum: a obtenção de tecidos com células em divisão, tratamento com colchicina para interrupção das células em metáfase, hipotonização para espalhamento dos cromossomos e fixação do material (HARE *et al.*, 1966; KASAHARA, 2009).

Considerando essas características, é compreensível a grande quantidade de informações citogenéticas sobre leucemias e neoplasias hematopoiéticas uma vez que elas estão associadas a maior facilidade em se obter boas preparações cromossômicas do cultivo de células sanguíneas em

relação aos tecidos sólidos (SUMNER, 2003). Ainda, os tumores sólidos geralmente apresentam baixo índice mitótico exigindo cultivos celulares de longo prazo, processo metodologicamente complexo e capaz de gerar uma linhagem portadora de alterações cromossômicas que não refletem a constituição cariotípica do tumor no indivíduo (SANDBERG *et al.*, 1988). Apesar dessas limitações, o cultivo celular de curto ou longo prazo ainda é a técnica mais frequentemente utilizada na obtenção de cromossomos em tumores sólidos (DEVITT *et al.*, 2009; REIMANN-BERG *et al.*, 2012; SARGAN *et al.*, 2005).

As técnicas de cultivo celular dependem de infraestrutura especializada incluindo, por exemplo, fluxo laminar para manutenção de ambiente asséptico e microscópio invertido para monitoração da multiplicação das células no frasco de cultura. Assim, esse não pode ser considerado um método de rotina, pois ainda são poucos os laboratórios de diagnóstico e clínicas devidamente equipados, especialmente em países em desenvolvimento. Além disso, a realização de cultura celular carece de padronização das técnicas de cultivo, por vezes consumindo muitos investimentos em testes para que se possa obter boa multiplicação celular *in vitro* (KASAHARA, 2009).

Por outro lado, a técnica de preparação direta é uma forma simples e rápida de se obter preparações cromossômicas, amplamente utilizada em estudos citogenéticos de insetos (WEBB *et al.*, 1978), peixes (NETTO *et al.*, 2007), anfíbios (BOGART, 1973), répteis (KING; ROFE, 1976), aves (SHOFFNER *et al.*, 1967) e pequenos mamíferos (FORD; HARMERTON, 1956). Nesse método, objetiva-se a visualização, em poucas horas, das células em divisão exatamente como no momento da coleta desde que tecidos em divisão celular possam ser obtidos (HARE *et al.*, 1966; KASAHARA, 2009).

Considerando que as células neoplásicas progridem continuamente em divisão celular (KUSEWITT; RUSH, 2007), a padronização de um método direto para obtenção de preparações cromossômicas de cânceres sólidos em cães é hipoteticamente possível. Por isso, esse trabalho buscou adaptar a preparação citogenética direta para tumor mamário canino (TMC) como método alternativo para a rotina laboratorial e pesquisa citogenética em cães.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de materiais foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (HOSPVET/UESC), em Ilhéus/BA, e na Clínica Veterinária Saúde Animal, na cidade de Jequié/BA. A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica (LABAP) pertencente ao Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/UFBA). As análises do material para estudo citogenético foram realizadas no Laboratório de Bactérias Aeróbicas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), em Ilhéus/BA, e no Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Jequié.

4.2.1 Animais

Foram utilizadas 10 fêmeas caninas para coleta de material, com ocorrência espontânea da neoplasia, atendidas entre janeiro e julho de 2012. Cinco animais eram provenientes de atendimento clínico veterinário no HOSPVET/UESC e os demais foram atendidos na Clínica Veterinária Saúde Animal. Estas fêmeas foram diagnosticadas clinicamente como portadoras de neoplasia mamária e receberam indicação cirúrgica para remoção do tumor ou tumores como parte do protocolo de tratamento. Todos os animais realizaram exames clínico e laboratorial como requisito pré-cirúrgico.

4.2.2 Coleta e análise anátomo-histopatológica

Para caracterização anátomo-histopatológica, imediatamente após a remoção cirúrgica do tumor, foram retirados fragmentos do tecido tumoral e obedecidas às normas básicas de colheita e fixação dos fragmentos em solução formol tamponada a 10% por 24 horas, incluindo preenchimento de formulário com os dados do animal e histórico da patologia. Posteriormente, as amostras devidamente identificadas foram mantidas em álcool 70° até envio para análise no Laboratório de Anatomia Patológica (HOSPMEV/UFBA). No Laboratório de Anatomia Patológica (HOSPMEV/UFBA) os fragmentos foram emblocados em parafina e microtomizados para montagem das lâminas, e, por fim, corados com hematoxilina-eosina e avaliados através de microscopia de luz.

4.2.3 Coleta e análise citogenética do tumor

A remoção do tumor de mama foi realizada mediante procedimento cirúrgico, utilizando-se a técnica adequada de acordo com o aspecto físico da neoplasia. Após a exérese do tumor ou tumores, quando existiu mais de uma massa tumoral no animal, foi realizada a coleta de tecido para exame citogenético. Seguindo-se os padrões de obtenção de fragmentos representativos, foram coletados 3 a 4 fragmentos de aproximadamente 1x1x1cm de cada massa tumoral e acondicionamento das amostras em meio RPMI 1640 resfriado. Na presença de mais de uma formação tumoral no animal, as amostras de cada tumor eram coletadas separadamente. O material foi mantido em refrigeração até a chegada ao laboratório de citogenética por, no máximo, 1 h.

4.2.4 Obtenção de cromossomos mitóticos das células tumorais

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos mitóticos das células tumorais foi a descrita por Netto *et al.* (2007) com modificações conforme descrito a seguir.

Em condições assépticas, fragmentos tumorais imersos no meio de cultura foram mecanicamente fracionados com tesoura e, posteriormente, raspados com auxílio de lâmina cirúrgica (acoplada a um cabo de bisturi) e pinça dente de rato. A solução resultante foi filtrada em compressa de gaze para remoção de fragmentos maiores. Em seguida, a solução foi transferida para tubo cônico de 15 ml e meio RPMI 1640 recém-descongelado foi adicionado até completar o volume de 9,5 ml.

Em seguida, cinco gotas de colchicina (0,05%) foram adicionadas ao tubo e a solução foi homogeneizada com pipeta Pasteur procedendo à incubação a 38°C por 30 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante ressuspenso em 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075 M).

Após 20 minutos de hipotonização a 38°C, cinco gotas de fixador Carnoy (75% de metanol e 25% de ácido acético) gelado e recém-preparado foram adicionadas para prefixação e a solução foi homogeneizada. Novamente, o material foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm.

Descartou-se o sobrenadante após a centrifugação e adicionou-se 8 ml de fixador Carnoy, homogeneizando-se o material com auxílio de pipeta

Pasteur e submetendo-o a centrifugação novamente por 10 minutos a 1500 rpm. O procedimento de fixação do material foi repetido por 3 vezes para se retirar restos celulares da suspensão. Após a última fixação, adicionou-se ao *pellet* 2 ml de fixador e, após homogeneização, a suspensão celular foi transferida para microtubos Eppendorf para estocagem a -20°C.

4.2.5 Preparo das lâminas para coloração

Lâminas para microscopia, lavadas e mantidas em álcool 70°, eram colocadas imersas em água destilada em banho-maria a 60°C. Depois de aquecidas, a suspensão celular foi pingada nas lâminas com filme de água em sua superfície. Depois da secagem as lâminas estavam prontas para serem utilizadas com a técnica de coloração.

4.2.6 Técnica de coloração convencional

As metáfases provenientes dos fragmentos de tecidos neoplásicos foram coradas pelo método convencional para estabelecimento do número diploide e fórmula cariotípica de cada amostra. As lâminas foram coradas com corante Giemsa diluído a 10% em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos. Lavadas em água destilada e, após secas, analisadas em microscópio óptico.

4.2.7 Análise das metáfases

As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Olympus BX51 sob aumento de 1000x acoplado com sistema digital de captura de imagens Image ProPlus (Media Cybernetics).

4.3 RESULTADOS

A análise histopatológica identificou mais de um tipo histológico em cinco materiais (Tabela 01), porém apenas do material número 1 foram coletadas amostras separadamente para análise citogenética, pois se tratava de massas tumorais diferentes em um mesmo animal.

Cromossomos mitóticos estavam ausentes nas suspensões celulares em apenas duas amostras entre os 10 materiais analisados, tomando por base a análise de cinco lâminas para cada preparação obtida. Os materiais 7 e 9 apresentaram classificações histológicas que não permitiram suas respectivas análises como de células provenientes exclusivamente de TMC. Portanto, as

suspensões celulares de todos estes materiais foram consideradas inadequadas para análise citogenética de células neoplásicas de TMC.

Dos demais materiais, foram analisadas no mínimo 30 metáfases ou pelo menos as metáfases presentes após varredura de 10 lâminas com a mesma preparação cromossômica. Os materiais que obtiveram melhores resultados quanto à presença de cromossomos mitóticos foram os materiais 1, 5, 6, 8 e 10, enquanto os materiais 2, 3 e 7 apresentaram em média 1 metáfase por lâmina (Tabela 01).

Em relação à qualidade das suspensões celulares, os materiais, em geral, apresentaram espalhamento insuficiente dos cromossomos mitóticos, sendo frequentemente observadas sobreposições de cromossomos. Também, foi possível identificar diferentes graus de condensação dos cromossomos entre os materiais, ora mais distendidos ora mais condensados.

Tabela 01: Classificação histológica das amostras de TMC e número de células metafásicas por amostra das preparações citogenéticas.

Amostra	Classificação histológica	Número de metáfases
Indivíduo 1 – amostra 1	Carcinoma complexo	36
Indivíduo 1 – amostra 2	Carcinoma em tumor misto e papiloma ductal	0
Indivíduo 2	Carcinoma papilar	13
Indivíduo 3	Carcinoma papilar e Carcinoma papilar ductal	10
Indivíduo 4	Carcinoma em tumor misto	0
Indivíduo 5	Carcinoma em tumor misto	30
Indivíduo 6	Adenoma papilar, Adenoma túbulo-papilar e Adenoma papilar com área focal de transformação carcinomatosa	30
Indivíduo 7	Carcinoma papilar, Hiperplasia lobular e Tumor misto benigno	10
Indivíduo 8	Carcinoma papilar	30
Indivíduo 9	Glândula mamária em lactação, Carcinoma em tumor misto e Carcinoma papilar	0
Indivíduo 10	Carcinossarcoma	105

4.4 DISCUSSÃO

A existência de mais de um tipo histológico em diferentes partes de um mesmo nódulo ou em diferentes tumores de um mesmo animal pode ocorrer em TMC (CASSALI *et al.*, 2011), o que foi confirmado em metade dos casos estudados neste trabalho. Considerando-se esta possibilidade, é apropriado o acondicionamento individualizado de fragmentos de TMC para a avaliação citogenética a fim de se evitar erros de coleta e de preparações citogenéticas com diferentes diagnósticos histológicos em uma mesma suspensão celular (caso dos materiais 7 e 9). No entanto, diferentes classificações histológicas de TMC em um mesmo material nem sempre comprometem a viabilidade da análise citogenética da suspensão celular, pois estas diferenças diagnósticas podem ser apenas em relação à organização estrutural do tecido, não afetando a sua caracterização celular (caso dos materiais 3 e 6).

A dificuldade de se observar metáfases em suspensão celular a partir de tumores sólidos, utilizando-se a preparação direta pode não estar apenas associada ao baixo índice mitótico (SANDBERG *et al.*, 1988), mas à difícil dissociação do tecido sólido no meio de cultura. A inadequada dissociação do tecido forma agregados celulares que podem mascarar a presença de metáfases. Uma alternativa para este problema seria o uso prévio de tratamento enzimático com colagenase como indicado para os materiais sujeitos a cultivo celular (REIMANN-BERG *et al.*, 2012), o que deve propiciar uma melhor desagregação celular e aumentar as chances de visualização de cromossomos mitóticos.

O número de metáfases analisadas para caracterização do cariótipo de tumores varia entre estudos citogenéticos (MAYR *et al.*, 1990; REIMANN *et al.*, 1999; WINKLER *et al.*, 2005; WINKLER *et al.*, 2006), porém a avaliação de pelo menos 30 metáfases é frequente. Desta forma, observa-se que cinco dos materiais estudados permitiram esta contagem em menos de 10 lâminas analisadas, indicando que suspensões celulares obtidas com a técnica de preparação direta podem fornecer um número satisfatório de metáfases para estudo de células neoplásicas de TMC.

Segundo Kasahara (2009), apesar das etapas de colchinação, hipotonização e fixação serem procedimentos fundamentais para se obter cromossomos mitóticos de boa qualidade para análise do cariótipo, diversos fatores podem influenciar os resultados citogenéticos, desde os tipos celulares

e a espécie estudada até metodologia adotada e os protocolos técnicos padronizados em cada laboratório. Neste estudo optou-se por utilizar o mesmo protocolo para todos os materiais a fim de testar sua ubiquidade como método de análise citogenética de TMC.

Entretanto, foi possível observar entre as suspensões celulares diferentes padrões de espalhamento, individualização e condensação dos cromossomos metafásicos (Figura 01). Esses resultados corroboram as observações de Netto *et al.* (2007) que, em protocolo citogenético para peixes, afirmam que variações na qualidade das metáfases pode requerer desenvolvimento ou adaptações da técnica de acordo com o objeto de estudo. No caso do TMC, sugere-se testar diferentes concentrações de solução de colchicina e diferentes tempos de hipotonização em um mesmo tecido tumoral a fim de se obter melhores resultados. Outro fator prejudicial no espalhamento e individualização dos cromossomos é a presença de resíduos citoplasmáticos na suspensão (KASAHARA, 2009). Como forma de solucionar este problema, a realização de várias lavagens, o uso de produtos que retirem o conteúdo citoplasmático durante a fixação e a diluição apropriada da solução pode levar à melhoria da qualidade da preparação citológica, visto que as preparações a partir de tecido sólido apresentam alta celularidade.

Cabe ressaltar que o uso desta técnica permite que estudos citogenéticos na área de oncologia canina possam ocorrer com mais constância devido à simplicidade de instalações e equipamentos necessários a sua realização. Embora não fosse o objetivo central desse trabalho, foi possível observar diferentes constituições cromossômicas entre os tipos tumorais estudados (Figura 01), onde as variações do número diploide, tanto em tumores benignos quanto malignos (Figura 01A e 01B) podem apresentar padrões próximos ao descrito para células de cães hípidos ($2n=78$). Portanto, este trabalho estimula pesquisadores citogeneticistas da área de oncologia canina a adotar esta metodologia, pois estudos com tumores sólidos em cães irão fornecer mais informações sobre as alterações cromossômicas das neoplasias caninas beneficiando estes animais e os estudos comparativos com a citogenética oncológica humana.

4.5 CONCLUSÃO

O protocolo de preparação direta para obtenção de cromossomos mitóticos a partir de tumores mamários caninos permite concluir que a utilização desta técnica favorece o estudo da citogenética de tumores caninos em laboratórios menos equipados e a baixo custo. Contudo, alterações dos procedimentos metodológicos aqui testados ainda são necessárias para aumentar principalmente a qualidade do espalhamento dos cromossomos.

5. CAPÍTULO II

ESTUDO CITOGENÉTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CÃES.

ESTUDO CITOGENÉTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CÃES

5.1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são as que apresentam maior incidência entre os diversos tipos de tumores que os cães podem desenvolver espontaneamente. Os tumores mamários são responsáveis por mais de 50% dos processos oncológicos nesta espécie (DALECK *et al.*, 1998). Raras em machos (BENJAMIN *et al.*, 1999; RUTTEMAN *et al.*, 2001), essas neoplasias acometem principalmente fêmeas maduras (BENJAMIN *et al.*, 1999; DE NARDI, 2002; OLIVEIRA FILHO, 2010).

Os dados de literatura são conflitantes em relação à frequência de TMC benignos e malignos (HELLMEN, 1993; MISDORP, 2002; OLIVEIRA, 2003), embora vários autores relatem frequências aproximadamente equivalentes (50%) para ambos (DALECK *et al.*, 1998; HELLMEN, 2005; MISDORP, 2002). Os carcinomas são citados como os TMC de ocorrência mais frequente entre os tipos histológicos malignos, com frequente emissão de metástases para linfonodos e pulmões (DALECK *et al.*, 1998; LANA *et al.*, 2007).

O carcinoma mamário canino é uma neoplasia de origem epitelial, caracterizada como uma doença heterogênea de grande diversidade histomorfológica (MISDORP, 1999). Classificam-se, segundo a OMS (1999), como carcinoma *in situ*, carcinoma simples, carcinoma complexo e carcinomas do tipo especial. Os carcinomas simples são formados por um único tipo celular e dividem-se, em ordem crescente de malignidade, como túbulo-papilares (com as variações tubular e papilar), sólidos e anaplásicos. Os carcinomas complexos diferenciam-se dos de tipo simples porque são formados por células epiteliais e mioepiteliais.

Estudos citogenéticos de tumores em cães são escassos quando comparados aos estudos em humanos (REIMANN-BERG *et al.*, 2012). Talvez esse fato esteja relacionado às dificuldades da citogenética canina, pois o cariótipo dessa espécie é formado por grande número de cromossomos ($2n=76$) com morfologia e tamanho semelhantes (REIMANN *et al.*, 1999). Todos os autossomos são acrocêntricos enquanto os cromossomos sexuais são metacêntricos, sendo o X de tamanho similar ao primeiro par autossômico e o Y o cromossomo de menor tamanho (BREEN *et al.*, 2001; REIMANN *et al.*, 1999).

Metáfases tumorais de cães, tanto de neoplasias benignas como malignas, tendem a apresentar aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais (REIMANN *et al.*, 1999). Geralmente, as aberrações numéricas, em especial as fusões cêntricas, ocorrem com mais frequência do que as estruturais nos casos de tumores caninos (DEVITT *et al.*, 2009). De modo geral, os tumores mesenquimais apresentam mais alterações cromossômicas do que os tumores epiteliais (REIMANN *et al.*, 1999).

Devido às semelhanças entre diversas doenças genéticas em cães e humanos, a espécie canina é utilizada como modelo de estudo para tais patologias, inclusive para vários tipos de câncer (OSTRANDER *et al.*, 2000; STRANDBERG; GOODMAN, 1974; WINKLER *et al.*, 2005). Por exemplo, em um caso de carcinoma de próstata canino foi encontrada polissomia do cromossomo 13. Esse tipo de tumor é similar aos encontrados nos humanos e a equivalência entre os cromossomos 13 e 8 de cada espécie sugere a existência de uma região homeóloga desempenhando importante papel no aparecimento desta anomalia tumoral (WINKLER *et al.*, 2006).

Assim, os estudos citogenéticos de tumores em cães permitem identificar alterações específicas dos cromossomos relacionadas à ocorrência da doença e aprofundar o conhecimento nas pesquisas oncológicas de ambas as espécies (REIMANN *et al.*, 1999; BREEN, 2008). É possível, então, inferir que tais estudos vão conduzir a melhorias no diagnóstico, tratamento e profilaxia dos tumores tanto em cães quanto em humanos.

Considerando essas possibilidades, este trabalho objetivou avaliar comparativamente o cariótipo de linfócitos periféricos e de células tumorais de carcinomas mamários de fêmeas caninas. Buscou-se determinar as possíveis alterações cromossômicas de caráter numérico e, quando possível, as alterações cromossômicas estruturais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de material foram realizadas na Clínica Veterinária Saúde Animal na cidade de Jequié/BA. A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica (LABAP) pertencente ao Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/UFBA). As análises do material para estudo citogenético

foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Jequié.

Foram utilizadas três fêmeas caninas atendidas entre janeiro e julho de 2012, com ocorrência espontânea da neoplasia, para coleta de sangue periférico e tecido tumoral mamário. Os animais incluíram uma cadela da raça poodle (10 anos de idade) e duas sem raça definida com 13 e 9 anos de idade.

A coleta do sangue para análise citogenética foi realizada imediatamente antes do animal ser encaminhado ao procedimento cirúrgico. Foi puncionada a veia cefálica com auxílio de seringa descartável com agulha 25x7 mm para retirada de 3 ml de sangue venoso, o qual foi acondicionado em tubo contendo o anticoagulante heparina sódica. O material foi mantido refrigerado, por no máximo 1 h, até a chegada ao laboratório para realização da cultura celular.

Cerca de 16 gotas do sangue coletado foram semeadas em 5 ml de meio de cultura para cariótipo (meio RPMI 1640 com HEPES, soro fetal bovino e fitohemaglutinina) em condições assépticas. O material foi incubado em estufa a 38°C por 71 horas e 30 minutos.

Os cromossomos mitóticos da cultura de linfócitos seguiu o protocolo descrito por Moorheard *et al.* (1960) com modificações conforme descrito a seguir.

Após o período de incubação, foram adicionadas quatro gotas de colchicina (0,025%), homogeneizando-se levemente o frasco. Novamente, o material voltou à estufa ajustada para 38°C por 30 minutos. Decorrido este período, o conteúdo foi transferido para tubo cônico de 15 ml e centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubado a 38°C por 20 minutos. Após esta etapa, acrescentou-se 10 gotas de fixador Carnoy (75% de metanol e 25% de ácido acético) gelado e recém-preparado para prefixação, homogeneizou-se o material e centrifugou-se por 10 minutos a 1500 rpm.

Descartou-se o sobrenadante após a centrifugação e adicionou-se 8 ml de fixador Carnoy, homogeneizando-se o material com auxílio de pipeta Pasteur e submetendo-o a centrifugação novamente por 10 minutos a 1500 rpm. A fixação do material foi repetida por três vezes para se retirar restos celulares da suspensão. Após a última fixação, adicionou-se 2 ml de fixador ao

pellet. Após homogeneização, o material foi transferido para microtubos Eppendorf para estocagem a -20°C .

As coletas e análises histopatológicas e citogenéticas dos TMC foram similares às descritas no capítulo anterior. O preparo das lâminas, coloração convencional e análise das metáfases também seguiu a mesma metodologia citada anteriormente.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 207 metáfases foi analisado das três fêmeas caninas, sendo 119 metáfases de linfócitos periféricos e 88 metáfases de células provenientes de carcinomas. Os dados referentes à idade dos animais, classificação histológica dos carcinomas, número de metáfases analisadas de linfócitos periféricos e de células tumorais de carcinomas encontram-se na tabela 01.

A faixa etária dos cães estudados corrobora os dados da literatura sobre a maior predisposição dos animais maduros ou idosos ao acometimento por tumores mamários (BENJAMIN *et al.*, 1999; DE NARDI, 2002; OLIVEIRA FILHO, 2010). Em relação à classificação dos carcinomas, a presença do carcinoma em tumor misto nesta pesquisa contribui com o estudo citogenético de um dos tipos de tumores mamários mais frequentes em cadelas (CASSALI *et al.*, 2011).

Tabela 01: Dados dos indivíduos, tipo histológico do tumor e índice mitótico das amostras de carcinomas mamários e dos linfócitos periféricos.

Indivíduo	Idade	Classificação histológica	Nº de metáfases (sangue)	Nº de metáfases (tumores)
1	10 anos	Carcinoma complexo	42	43
5	13 anos	Carcinoma em tumor misto	30	27
8	9 anos	Carcinoma papilar	47	18

A partir da contagem de cromossomos nas metáfases de linfócitos periféricos e células tumorais desses indivíduos foi possível definir os números diploides modais e variações numéricas nos cromossomos (Tabelas 02 e 03).

Observando a distribuição dos números diploides entre as células do sangue periférico e dos tumores, observa-se a manutenção do número modal

Tabela 02: Números diploides encontrados nas células de linfócitos periféricos de cães portadores de carcinomas mamários.

Indivíduo	Números diploides de linfócitos																				Total		
	49	53	57	59	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77		78	
1	2		1	1	1	1	1	1	2	2	2	2		3	3	1		2	2	1	14	42	
5		1					1		1	2	1	1	1	1	2						2	17	30
8									2		1		1			2	5	6	7	7	16	47	
Total	2	1	1	1	1	1	2	1	5	4	4	3	2	4	5	3	5	8	9	10	47	119	
%	1,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1,7	0,8	4,2	3,4	3,4	2,5	1,7	3,4	4,2	2,5	4,2	6,7	7,6	8,4	39,5	100,0	

Tabela 03: Números diploides encontrados nas células neoplásicas de carcinoma mamário canino.

Indivíduo	Números diploides de células neoplásicas																		Total
	41	42	48	58	60	64	66	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81		
1								2		1	1	5	8	13	9	2	2	43	
5	1	1	1		1	1	1		1	2	2	3	3	5	3	2		27	
8				1						3	4	1	1	6		2		18	
Total	1	1	1	1	1	1	1	2	1	6	7	9	12	24	12	6	2	88	
%	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	2,3	1,1	6,8	8,0	10,2	13,6	27,3	13,6	6,8	2,3	100,0	

padrão da espécie ($2n=78$). Contudo, algumas células neoplásicas (22,6%) apresentaram números diploides superiores, variando de $2n=79$ a $n=81$.

Números diploides inferiores a $2n=78$ foram observados tanto em células linfocitárias como neoplásicas. Enquanto a variação para números inferiores ao descrito para espécie normalmente é atribuída a artefatos técnicos como espalhamento excessivo de cromossomos de células com números diploides altos ou cromossomos encobertos por outras estruturas (BREEN *et al.*, 2001; REIMANN *et al.*, 1999), os números elevados (>78) devem ter algum significado biológico, indicando a ocorrência de fissões cromossômicas.

Esses dados são similares aos descritos por outros autores em diferentes tumores caninos. Por exemplo, Mayr e Kramberger-Kaplan (1992) analisaram citogeneticamente três sarcomas mamários de cães e relataram que 60% das células neoplásicas apresentavam $2n=78$ sem alterações detectáveis. Em um caso de melanoma maligno, Mayr *et al.* (1992) também observaram que metade das metáfases analisadas tinha números cromossômicos normais.

Considerando que a maioria dos tumores tem natureza clonal (KUSEWITT; RUSH, 2007), a presença de metáfases de tecido tumoral sem mudanças de $2n$ pode ser justificada, visto que é a partir destas células que se inicia a transformação neoplásica.

Por outro lado, outros estudos com carcinomas mamários já relataram alterações numéricas do tipo hipodiploidia, hiperdiploidia e número cromossômico próximo a tetraploidia (OWEN *et al.*, 1977, 1981; ELSE *et al.*, 1982; NORVALL *et al.*, 1984; WOLFE *et al.*, 1986). Mayr *et al.* (1991) ainda detectaram trissomia do par 1 e monossomia do X em animais com carcinoma. Desse modo, os números maiores que $2n=78$ em células de carcinomas das amostras estudadas pode ser portadora de alterações similares (trissomias), ainda que em frequência reduzida em relação ao descrito pelos autores supracitados.

A análise cariotípica das metáfases selecionadas nesse trabalho permitiu comparar a estrutura cromossômica das células normais com as tumorais (Figuras 01 a 03). Além das variações numéricas já comentadas, foram encontradas alterações estruturais nas análises realizadas nos cromossomos em metáfases da preparação direta de células tumorais nos três

animais. Mesmo considerando a ligeira diferença no grau de condensação do par 1 no cariótipo dos linfócitos do indivíduo 1 (Figura 01A), é possível observar que um dos cromossomo do par 1 em células neoplásicas tem tamanho muito superior ao do cromossomo sexual (Figura 01B), caracterizando heteromorfismo do par 1. Nas células tumorais do indivíduo 5 é observada a presença de um metacêntrico extra (Figura 02B e 02C), enquanto cromossomos submetacêntricos, provavelmente o cromossomo sexual, foram identificados nas células de carcinoma do indivíduo 8 (Figura 03B).

O cromossomo do par 1 com tamanho superior ao normal (Figura 01) sugere duplicação de segmento cromossômico ou translocação não-recíproca com outro cromossomo do complemento, uma vez que não foi possível estabelecer com precisão o cariótipo das células do carcinoma complexo. No indivíduo 5, a ocorrência de cromossomo metacêntrico pequeno pode ser considerado um cromossomo extra, comumente encontrado em diferentes tipos tumorais (BARTNITZKE *et al.*, 1992; MAYR *et al.*, 1990; MAYR; ESCHBORN, 1991; MAYR; KRAMBERGER-KAPLAN, 1992) ou fusão com perda de segmentos cromossômicos entre dois acrocêntricos. Por outro lado, a modificação do cromossomo sexual no indivíduo 8 pode ser atribuída a inversão pericêntrica.

Alterações estruturais são amplamente descritas em estudos citogenéticos de tumores em cães, incluindo deleções e fusões cêntricas nos cromossomos 5/6, 5/14, 7/15, 9/17 e deleção do cromossomo 1 em hemangiopericitoma (MAYR *et al.*, 1990). Fusões cêntricas também são comuns entre os cromossomos 1/3, 1/30, 2/19, 3/19, 12/18 e 13/17 em osteossarcoma (MAYR; ESCHBORN, 1991). Em tumores sólidos caninos, tanto fusões cêntricas como translocação foram identificadas (MAYR, 1994).

A diversidade de alterações estruturais descrita nesse trabalho confirma que os carcinomas mamários são heterogêneos e podem estar associados a diferentes rearranjos. Esse é um resultado diferenciado do observado, por exemplo, em tumores venéreos caninos, onde fusões cromossômicas com redução do $2n=78$ são identificadas em todos os casos (MUKARATIRWA; GRUYS, 2003). O uso de marcadores refinados com bandamentos que identifiquem os pares ou sondas cromossomo-específicas pode auxiliar na confirmação das alterações microestruturais aqui propostas. Da mesma forma, a ampliação dos estudos em outras amostras de carcinoma com a mesma

classificação histológica é importante para verificar se as diferentes alterações encontradas podem ser associadas a tipos específicos de carcinoma.

5.4 CONCLUSÃO

Apesar do potencial diagnóstico e prognóstico da citogenética de tumores caninos, a heterogeneidade do comportamento cromossômico de células de carcinomas mamários caninos dificulta a utilização da citogenética para diagnóstico de carcinoma quando se utiliza unicamente a coloração convencional.

6. CAPÍTULO III

**ESTUDO DE CASO: ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE UM
CARCINOSSARCOMA MAMÁRIO CANINO.**

ESTUDO DE CASO: ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE UM CARCINOSSARCOMA MAMÁRIO CANINO

6.1 INTRODUÇÃO

A classificação da OMS (1999) define carcinossarcoma como um tipo neoplásico constituído pela presença de componentes epiteliais e mesenquimais. O carcinossarcoma apresenta ocorrência esporádica na espécie canina, com crescimento tumoral rápido e períodos de sobrevivência pós-cirúrgica prolongados (MISDROP *et al.*, 1999). São tumores raros em mulheres e têm um prognóstico desfavorável em comparação com outros tipos de carcinomas (TOKUDOME *et al.*, 2005). No cão, as características clínicas e patológicas são semelhantes às descritas em humanos (Cassali *et al.*, 2011).

Em termos citogenéticos, há mais de 62 000 cariótipos de neoplasias são listados em humanos (MITELMAN DATABASE OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND GENE FUSIONS IN CANCER; 2013). No entanto, em cães, o estudo citogenético dos tumores é um grande desafio, pois o cariótipo canino está entre os mais complexos dentre os mamíferos domésticos (REIMANN-BERG *et al.*, 2012). Entre os fatores de dificuldade de identificação cromossômica em cães destaca-se o elevado número diploide ($2n=78$) associado à similaridade de tamanho e padrões de bandamento dos menores autossomos (BREEN *et al.*, 2001).

Em geral, as neoplasias caninas são caracterizadas por alterações numéricas, especialmente as fusões cêntricas (DEVITT *et al.*, 2009). Assim como os tumores sólidos em humanos, os tumores mesenquimais apresentam mais alterações cromossômicas do que os epiteliais tanto em neoplasias benignas ou malignas (REIMANN *et al.*, 1999).

Entre os diferentes tipos de alterações numéricas, a presença de aneuploidias e fusões cêntricas são as mais fáceis de reconhecer. Porém, em cães, a precisa identificação dos componentes cromossômicos dessas alterações é difícil. No caso de alterações diagnosticadas em cães, as aneuploidias relacionadas às alterações dos cromossomos sexuais são as alterações numéricas mais frequentemente observadas e as estruturais são raramente descritas, sendo quase exclusivamente encontradas em células caninas neoplásicas (BREEN *et al.*, 2001).

Um estudo citogenético de 270 tumores sólidos caninos, com predominância de tumores de mama, mostrou que o segundo par autossômico e o cromossomo X são os alvos preferenciais dos rearranjos, envolvendo alterações numéricas e estruturais, respectivamente (REIMANN *et al.*, 1999). Além disso, os pares cromossômicos 1, 19 e 25 estão, preferencialmente, envolvidos em fusões cêntricas. Este estudo ainda possibilita a comparação entre a citogenética canina e humana por meio da identificação de alterações cromossômicas específicas para cada tipo tumoral.

Recentemente, Reimann-Berg *et al.* (2012) também revelaram a relevância do cromossomo 13 nas alterações tumorais em cães. Esses autores afirmam que este cromossomo apresenta alta homeologia com as regiões dos cromossomos humanos 4 e 8 que abrigam os proto-oncogenes c-KIT e c-MYC. Ambos os genes estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de algumas doenças tumorais humanas e caninas.

Adicionalmente, os tumores mamários caninos compartilham características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas similares às neoplasias em humanos (MISDORP, 2002). Neste contexto, a citogenética comparativa ajudará a definir regiões genômicas comumente afetadas por alterações cromossômicas em ambas as espécies e, assim, facilitar a identificação de alterações moleculares importantes (REIMANN *et al.*, 1999).

Considerando estas informações, visou-se analisar comparativamente o cariótipo de linfócitos periféricos e de células tumorais de um carcinossarcoma de cadela. A fim de avaliar as possíveis alterações cromossômicas de caráter numérico e estrutural presentes nas células neoplásicas, foram utilizadas metodologias de coloração convencional, bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Uma fêmea canina de 14 anos da raça Poodle, com ocorrência espontânea da neoplasia mamária (Figura 01), atendida na Clínica Veterinária Saúde Animal em Jequié/BA em agosto de 2012 foi utilizada nesse estudo. Após o diagnóstico clínico, a cadela recebeu indicação cirúrgica para exérese da formação como parte do protocolo de tratamento. O animal realizou exames clínico e laboratorial como requisito pré-cirúrgico.

Após a cirurgia, fragmentos do tumor foram encaminhados para análise histopatológica no Laboratório de Anatomia Patológica (LABAP) pertencente ao Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/UFBA). Com os dados de histopatologia, a neoplasia foi classificada como carcinossarcoma mamário canino.

Amostras de sangue periférico e fragmentos do tumor também foram coletados para estudo citogenético realizado no Laboratório de Citogenética do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié.

As preparações citogenéticas das células do sangue periférico (linfócitos) e dos fragmentos da neoplasia mamária seguiram as metodologias descritas por Moorheard *et al.* (1960) e modificada de Netto *et al.* (2007), respectivamente. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato pH 6,8 para contagem cromossômica e cariotipagem.

6.2.1 Técnica de bandamento C

O bandamento C para visualização das regiões heterocromáticas seguiu o protocolo de Sumner (1972) com algumas modificações, tais como: hidrólise em HCl 0,2 N por 9 minutos à temperatura ambiente, tratamento em solução de hidróxido de bário 5% a 42°C por 20 segundos e rápida lavagem em HCl 0,2N e incubação em solução salina citratada 2xSSC a 60°C por 9 minutos. Após o procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e coradas com Giemsa diluído a 10% em tampão fosfato (pH 6,8) por 8 minutos.

6.2.2 Técnica de tripla coloração (CMA₃/ DA/ DAPI)

A tripla coloração com os fluorocromos cromomicina A₃ (CMA₃), distamicina (DA) e 4,6-diamino-2- fenilindol (DAPI) foi realizada de acordo com a técnica de Schmid (1980) para detectar as regiões ricas em GC (CMA₃⁺) ou em bases AT (DAPI⁺). A distamicina age como um competidor a fim de evitar marcações inespecíficas dos demais fluorocromos.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 210 metáfases foi analisado entre as técnicas de coloração convencional, bandamento C e coloração com fluorocromos base-específicos.

Deste total, 105 metáfases provenientes das células de linfócitos de sangue periférico e 105 metáfases de células neoplásicas do carcinossarcoma mamário canino foram fotografadas e analisadas.

A contagem das metáfases dos linfócitos periféricos permitiu a identificação de número diplóide modal $2n=78$ (56,2%) (Figura 02A), coincidindo com o padrão característico para a espécie (GUSTAVSSON, 1964). A variação do número cromossômico nos linfócitos foi de 41 a 77 cromossomos identificados em 46 metáfases. Contudo, a maioria destas (58,7%) apresentou $2n$ próximo ao modal para a espécie (70 a 77 cromossomos). Este evento pode ser justificado pelo espalhamento excessivo dos cromossomos ou sobreposição entre eles, devido ao elevado número diploide canino, caracterizando um artefato técnico (BREEN *et al.*, 2001; REIMANN *et al.*, 1999).

Por outro lado, as células do tecido neoplásico demonstraram elevado número cromossômico (Figura 02B e 02C), com variação de 104 a 153 cromossomos. Destas células, 80% apresentaram hipertriploidia (118 a 136 cromossomos), 10,5% hipotetraploidia (137 a 153 cromossomos), 5,7% hipotriploidia (104 a 116 cromossomos) e 3,8% triploidia ($2n=117$).

Cariótipos hipotriploides (105 a 110 cromossomos) também foram identificados em uma linhagem celular de primeira passagem proveniente de um carcinoma canino primário e espontâneo (ELSE *et al.*, 1982). Stone *et al.* (1991) relataram número cromossômico modal $2n=93$ em um de quatro mastocitomas caninos analisados, representando 15% das células neoplásicas do estudo. Adicionalmente, alteração numérica de 90 a 99 cromossomos foi observada em um de dos dois osteossarcomas caninos estudados por Mayr e Eschborn (1991).

Considerando a malignidade dos carcinossarcomas e carcinomas mamários, mastocitomas e osteossarcomas em cães, pode-se inferir a possibilidade de que a poliploidia seja um subproduto deste evento. Se a poliploidia (Figura 03) está relacionada à malignidade do carcinossarcoma, os dados deste trabalho indicariam um estágio agressivo da neoplasia aqui analisada, uma vez que os números cromossômicos encontrados foram mais elevados que os descritos pelos autores supracitados. Contudo, para confirmar essa sugestão seria necessário um estudo experimental com várias amostras de carcinossarcoma canino.

Em humanos, foi identificado que o carcinossarcoma mamário também determina cariótipos complexos com números próximos à triploidia a partir de um único tronco celular, confirmando a origem monoclonal dos tumores (TEIXEIRA *et al.*, 1998). As similaridades das alterações numéricas entre o carcinossarcoma dessas duas espécies também fornecem uma nova confirmação de que os achados citogenéticos das neoplasias caninas podem ser úteis para entender a evolução de cânceres em seres humanos.

Além das euploidias, alterações aneuplóides foram também observadas nas células analisadas de carcinossarcoma canino. Porém, não foi possível quantificá-las devido à ocorrência de sobreposições e o diminuto tamanho de alguns cromossomos que impediram a caracterização inequívoca destas estruturas. Entre as aneuploidias identificadas, destacam-se a trissomia do par 1 e do cromossomo X (Figura 03), uma vez que esses cromossomos podem ser reconhecidos facilmente devido ao grande tamanho ou morfologia diferenciada. Estudos citogenéticos prévios também indicam a ocorrência de trissomia do primeiro par em cães, conforme observado em adenocarcinoma tubular tipo complexo em glândula mamária de uma fêmea canina. Nesse estudo, 90% das células apresentaram $2n=79$ com trissomia do cromossomo 1 (MAYR; ESCHBORN, 1991).

Deve-se ressaltar que além da trissomia do cromossomo X, a presença de mais de dois cromossomos submetacêntricos nas células de carcinossarcoma mamário pode resultar da fusão de cromossomos acrocêntricos em células triplóides e hipertriplóides. Ainda, foram identificados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos de diferentes tamanhos nas células tumorais (Figura 03), sugerindo a presença de células originalmente tetraplóides que tiveram o número cromossômico reduzido (metáfases hipertriplóides) devido à ocorrência de inversões pericêntricas ou fusões.

Essa é uma hipótese menos parcimoniosa porque envolveria mais passos (poliploidização, fusões e inversões), mas que não pode ser descartada. Além disso, estudos citogenéticos com células de mastocitomas caninos revelaram aumento no número de cromossomos metacêntricos e perda de cromossomo X (STONE *et al.*, 1991) enquanto casos de osteossarcoma canino apresentaram alterações estruturais com diversas fusões cêntricas (MAYR; ESCHBORN, 1991). Dessa forma, bandamentos de

alta resolução devem ser realizados a fim de confirmar quais alterações ocorreram nas células neoplásicas além das alterações numéricas.

Utilizando técnicas de citogenética molecular e biologia molecular a fim de proporcionar uma análise mais detalhada de anormalidades citogenéticas em tumores caninos, um estudo com dois fibrossarcomas de fêmeas da raça Labrador identificou deleção no cromossomo 11 e trissomia no cromossomo 30 em ambos os casos, além da evidência de envolvimento do gene TGFBR1. Neste estudo foi possível a descrição citogenética através da atribuição inequívoca e completa de todos os cromossomos, incluindo cromossomos de translocação, assim como a caracterização parcial ao nível molecular. Porém, um número muito maior de tumores terá que ser analisado desta maneira para elucidar mais detalhadamente a relação entre as alterações cariotípicas, comportamento do tumor, o prognóstico em cães e para proporcionar uma maior compreensão do valor comparativo de sarcomas caninos para a medicina humana (SARGAN *et al.*, 2005).

Por exemplo, usando técnicas de citogenética molecular, Thomas *et al.* (2009) testaram a hipótese de associação entre raça e a distribuição do número de cópias de desequilíbrios genômicos em cães. Esses autores sugeriram que cães das raças Golden Retriever e Rottweiler diagnosticados para osteossarcomas apendicular canino com ocorrência espontânea abrigam alterações citogenéticas recorrentes e que são evolutivamente consistentes com as relatadas em humanos.

Infelizmente, esse nível de refinamento da análise cariotípica ainda é raramente encontrado na citogenética de cães. Contudo, embora outros bandamentos sejam necessários para a melhor compreensão do comportamento cromossômico no osteossarcoma canino, os métodos de rotina são também informativos, como mostrado nesse trabalho.

Nesse sentido, o uso comparativo do bandamento C pode evidenciar rearranjos cromossômicos mais sutis como ganhos ou perdas de regiões heterocromáticas (Kasahara, 2009). Nas amostras estudadas, esse método revelou que os cromossomos das células normais apresentam heterocromatina nas regiões pericentroméricas (Figura 04A), como acontece na maioria das espécies (GUERRA, 1988). Por outro lado, poucas marcações de banda C foram encontradas nas células tumorais (Figura 04B), apesar do número cromossômico excedente. Dessa forma, os dados de bandamento C indicam

que perdas de segmentos heterocromáticos ocorreram nas células neoplásicas, o que favorece a ocorrência de fusões cêntricas entre cromossomos formalmente acrocêntricos (IMAI, 1991; WICHMAN *et al.*, 1991).

Os resultados apresentados pela coloração com fluorocromos base-específicos também reforçam o papel da perda de blocos de heterocromatina nas metáfases tumorais. No caso das células normais ($2n=78$), segmentos ricos em bases GC (CMA_3^+) foram detectados em 10 cromossomos (Figura 05A). Diferentemente do esperado, as células do carcinossarcoma mamário apresentaram até 11 cromossomos marcados com CMA_3 apesar dos números diplóides acentuadamente altos (Figura 05B).

O conjunto desses dados demonstra que, como em humanos, o carcinossarcoma em cães é caracterizado por elevada instabilidade genômica, determinando cariótipos com diferentes alterações estruturais e numéricas. Tais alterações devem conduzir ao desbalanceamento entre oncogenes e genes supressores associados a este tipo tumoral.

6.4 CONCLUSÃO

Este estudo reforça a premissa da associação entre os achados em tumores caninos e humanos. Conseqüentemente, a ampliação dos dados sobre citogenética das neoplasias caninas pode trazer benefícios ao diagnóstico e prognóstico da patologia para ambas as espécies.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização do protocolo de preparação direta para obtenção de cromossomos mitóticos a partir de tecido neoplásico de glândula mamária canina mostrou-se uma técnica simples e de baixo custo, embora sejam necessárias alterações dos procedimentos metodológicos aqui testados.
- Considerando somente o uso da técnica de coloração convencional, conclui-se que, devido à heterogeneidade do comportamento cromossômico de células de carcinomas mamários, a avaliação citogenética detalhada de carcinoma mamário canino é improvável.
- Os achados citogenéticos em um caso de carcinossarcoma mamário canino reforçam o argumento de similaridade entre as neoplasias em humanos e caninos. Neste sentido, a intensificação dos estudos citogenéticos de tumores em cães beneficiará ambas as espécies.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.: **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed., Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2004.
- ALLEN *et al.*: Cytologia Differentiation of Benign from Malignant Canine Mammary Tumors. **Vet. Pathol.**, v. 72, p. 90-97, 1986.
- ARLEY, R.: Lab Reports and Cat Scans: can veterinary oncology guide our way to new treatments for human cancers? **Future Med. Chem.**, v. 4(11), p. 1391-1394, 2012.
- BENJAMIN *et al.*: Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasm Based on Life-Span Observations in Beagles. **Vet. Pathol.**, v. 36, p. 423-436, 1999.
- BOGART, J. P.: Method for Obtaining Chromosomes. **Caldasia**, v. 11, p. 29-40, 1973.
- BREEN & MODIANO: Evolutionarily Conserved Cytogenetic Changes in Hematological Malignancies of Dogs and Humans – man and his best friend share more than companion ship, **Chromosome Research**, v. 16, p. 145-154, 2008.
- BREEN *et al.*: Cytogenetics and Physial Chromosome Maps. In: Ruvinsky & Sampson (ed.): **The Genetic in Dog**, CABI, NY, p. 299-328, 2001.
- BREEN, M.: Canine Cytogenetics – From band to basepair. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 120(1-2), p. 50-60, 2008.
- CASSALI *et al.*: Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors, **BJVP**, v. 4(2), p. 153-180, 2011.
- CAVALCANTI & CASSALI: Fatores Prognóstico Clínico e Histopatológico dos Tumores de Mama em Cadelas – Revisão. **Clínica Veterinária**, n. 11, p. 56-64, 2006.
- DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos Clínico e Cirúrgicos do Tumor Mamário Canino. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998.
- DE NARDI, A. B. *et al.*: Prevalência de Neoplasias e Modalidades de Tratamento em Cães, Atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.
- DEVITT, J. J.; MARANON, D. G.; EHRHART, E. J.; BACHAND, A. M.; LANA, S. E.; LARUE, S. M. Correlations between Numerical Chromosomal Aberrations in the Tumor and Peripheral Blood in Canine Lymphoma. **Cytogenet. Genome Res.**, v. 124, p. 12-18, 2009.
- EGENVALL, A.; BONNETT, B. N.; OHAGEN, P.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A.; EULER, H. V. Incidence of and Survival After Mammary Tumors in A Population of Over 80.000 Insured Female Dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Prev. Vet. Med.**, v. 69, p. 109-127, 2005.
- ELSE, R. W.; NORVAL, M. & NELL, W. A.: The Characteristics of a Canine Mammary Carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 46, p. 675-681, 1982.
- ESTRELA; LIMA *et al.*: Immunophenotypic Features of Tumor Infiltrating Lymphocytes from Mammary Carcinomas in Female Dogs Associated with Prognostic Factors and Survival Rates: **BCM Cancer**, 2010; v. 10, p. 256.
- FONSECA & DALECK.: Neoplasias Mamárias em Cadelas: influência hormonal e efeitos do ovário – histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p.731-735, 2000.

FORD, C. & HARMERTON: A Colchicine, Hypothonic Citrate, Squash Sequence for Mammalian Chromosomes. **Stain Technology**, v. 31, p. 247-251, 1956.

FUJINAGA *et al.*: Chromosome Analysis of Canine Transmissible Sarcoma Cells. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, Reihe: Anatomie, Histologie, Embryologie, v. 36, n. 7, p. 481-489. 1989.

GOMES *et al.*: Carcinoma Inflamatório Mamário Canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, UFRGS, **FAVET**, v. 34, p. 171-174, 2006.

GRAPHODATSKY *et al.*: High-resolution GTN-banding Patterns of Dog and Silver Fox Chromosomes: description and comparative analysis. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 69, p. 226-231, 1995.

GUERRA, M. Os Cromossomos Metafásicos e o Ciclo Mitótico. In: GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, cap. 1, p. 1-12, 1988.

GUERRA; SOUZA.: **Como Observar Cromossomos**. FUNPEC, Editora Ribeirão Preto, 2002.

GUSTAVSSON: The Chromosomes of the Dog. **Hereditas**, v. 51, p. 187-189, 1964.

HARE *et al.*: Cytogenetics in dog and Cat. **J. Small Anim. Pract. Pergamon Press**, v. 7, p. 75-92, 1966.

HELLMEN *et al.*: Prognostic Factors in Canine Mammary Tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases: **Vet. Pathol.**, v. 30, p. 20-37, 1993.

HELLMEN: Complex Mammary Tumors in the Female Dog: a review, **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 90-97, 2005.

HOWARD-PEEBLES; PRIOR: The R-banding Pattern of the Canine Karyotype. **Journal of Heredity**, v. 71, p. 361-362, 1986.

HSU; MOORHEAD: Chromosome Anomalies in Human Neoplasms with Special Reference to the Mechanisms of Polyploidization and Aneuploidization in the Hela Strain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63, p. 1083-1094, 1956.

IMAI, H. T.: Mutability of Constitutive Heterochromatin (C-Bands) During Eukaryotic Chromosomal Evolution and their Cytological Meaning. **Japanese Journal of Genetics**, v. 66, p. 653-661, 1991.

KASAHARA: **Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Citogenética, 2009.

KHANNA, C. et al. The Dog as a Cancer Model. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, n. 9, p. 1065-1066, 2006.

KING M. & ROFE, R.: Karyotypic Variation in the Australian *Gekko Phyllodactylos Marmoratus*. **Chromosoma**, v. 57, p. 75-87, 1976.

KUSEWITT & RUSCH: Neoplasia e Biologia Tumoral. In: MACGARVIN & ZACHARY: **Bases da Patologia em Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, p. 253-298, 2007.

LANA *et al.*: Tumors of the Mammary Gland. In: WITHOROW *et al.*: **Withrow & Mac Ewen's Small Animal Clinic Oncology**, 4 ed. Saunders Company, p. 619-636, 2007.

LANGFORD *et al.*: Chromosome-Specific Paints from High-resolution Flow Karyotype of the Dog. **Chromosome Research** v. 4, p. 115-123, 1996.

LINDBLAD-TOH *et al.*: Genome Sequence, Comparative Analysis and Haplotype of the Domestic Dog. **Nature**, v. 438, p. 803-819, 2005.

LORENZOVA *et al.*: Patient Survival Periods and Death Causes Following Surgical Treatment of Mammary Gland Tumors Depending of Histological Type of Tumors: retrospective study of 221 cases. **ACTA VET. BRNO**, v. 79, p. 289-297, 2010.

MANOLACHE *et al.*: Banding Analysis of the Somatic Chromosomes of the Domestic Dog. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 18, p. 513-518, 1976.

MAYR & KRAMBERGER-KAPLAN: Analysis of Complex Cytogenetic Alterations in Three Canine Mammary Sarcomas. **Research in Veterinary Science**, v. 53, p. 205-211, 1992.

MAYR *et al.*: A New Type of Robertsonian Translocation in the Domestic Dog. **Journal of Heredity**, v. 77, p. 127, 1986.

MAYR *et al.*: Cytogenetic Studies in a Canine Mammary Tumor. **Elsevier Science Publ., Cancer Genetic Cytogenetic**, v. 47, p. 83-87, 1990.

MAYR *et al.*: Cytogenetic Characterization of Mammary Tumors in Two Domestic Dogs. **Journal of Veterinary Medical Education**, v. 38(2), p. 141-7. 1991. Medical

MAYR, B. & ESCHBORN, U.: Characterization of Complex Karyotype in Two Canine Bone Tumours. **Research in Veterinary Science**, n. 51, p. 341-343, 1991.

MAYR: Cytogenetic Analysis of Four Solid Tumours in Dogs. **Res. Vet. Sci.**, v. 57(1), p. 88-95, 1994.

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

MISDORP, W. *et al.*: Definitions and Explanatory Notes. Who Historical Classifications of Mammary Tumors of the Dog and Cat. **Washington: Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

MITCHELL *et al.*: Mammary Tumors in Dogs: survey of clinical and pathological characteristics. **Canadian Veterinary Journal**, v. 5, n. 15, p.131-138, 1974.

MITELMAN DATABASE OF CHROMOSOME ABERRATIONS AND GENE FUSIONS IN CANCER. Mitelman, F.; Johansson, B.; Mertens, F.. (Ed.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, 2013.

MOORHEAD, P. S.; NOWEL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MORENO-MILLAN *et al.*: Contribution to The Establishment of the R-Banded Karyotype in the Dog. **Genetic Selection Evolution**, v. 23 (Suppl 1), p. 179-182, 1991.

MOULTON *et al.*: Canine Mammary Tumors. **Vet. Pathol.**, v. 7, p. 289-320, 1970.

MOULTON, J. E. Tumors of the Mammary Gland. In: MOULTON, J. E. Tumors in domestic animals. **Berkeley, Los Angeles, London: Ed. Univ. of Calif. Press**, cap. 11, p. 346-372, 1978

MOULTON, J.E. Tumors in Domestic Animals. 3.ed. **London : University of California**, 1990.

NETTO *et al.*: A Standard Protocol for Obtaining Fish Chromosomes Under Post-mortem Conditions. **Micron**, v. 38, p. 214-217, 2007.

NORVALL, M.; MAINGAY, J. & ELSE, R. W.: Studies of Three Canine Mammary Carcinoma Cell Lines: *in vitro* properties. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 20, p. 1489-1508, 1984.

OLIVEIRA FILHO *et al.* Estudo Retrospectivo de 1.647 Tumores Mamários em Cães. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 30, n. 2, p. 77-185, 2010.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D.: Aspectos Epidemiológicos da Neoplasia Mamária Canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

OSTRANDER, E. A.; GALIBERT, F.; PATTERSON, D. F. Canine Genetics Come of Age. **Trends Genet.**, v. 16, n. 3, p. 117-124, 2000.

OWEN, L. N., MORGAN, D. R., BOSTOCK, D. E. & FLEMANS, J. R.: Tissue Culture and Transplantation Studies on Canine Mammary Carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 13, p. 1445-1449, 1977

PATEL: Cytogenetic Studies of Cell Lines; MDCK and VERO, **Wayamba Journal of Animal Science**, vol. 4, 2012.

PAWLOWSKI, K. M.; KROL, M.; MAJEWSKA, A. *et al.*: Comparison of Cellular and Tissue Transcriptional Profiles in Canine Mammary Tumor. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60 (suppl 1), p. 85-94, 2009.

PELETEIRO: Tumores Mamários na Cadela e na Gata. **Rev. Port. de Ciências Vet.**, v. 89, p. 10-29, 1994.

PEREZ ALLENZA *et al.*: Clinical and Pathological Prognostic Factors in Canine Mammary Tumor. **Ann. Inst. Super. Savità**, v. 33, n. 4, p.581-585, 1997.

PEREZ ALLENZA *et al.*: Factors Influencing the Incidence and Prognosis of Canine Mammary Tumours. **Journal of Small Practice**, v. 41, p. 287-291, 2000.

POULSEN *et al.*: Banding Studies in *Canis Familiaris*. Replication patterns in karyotypes from lymphocyte. **Cytobios**, v. 62, p. 161-165, 1990.

QUEIROGA *et al.*: Cox-2 Level in Canine Mammary Tumors, Including Inflammatory Mammary Carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. **Anticancer Research**, v. 25, p. 4269-4276, 2005.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores Mamários Caninos – Novas perspectivas. In: **Anais. Congresso de Ciências Veterinárias**, Oeiras, Portugal. p. 183-190, 2002.

QUEIROGA, F.; LOPES, C.: Tumores Mamários Caninos, Pesquisa de Novos Fatores Prognósticos. **Rev. Port. Ciên. Vet.**, RPCV, v. 97(543), p. 119-120, 2002.

REIMANN, N.; NOLTE, I.; BARTNITZKE, S.; BULLERDIEK, J.: Cancer Genetics Going to the Dogs. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 91, n. 19, p. 1688-1689, 1999.

REIMANN-BERG *et al.*: Chromosome Analyses in Dog. **Tierärztliche Praxis Kleintiere**, v. 3, p. 191-196, 2012.

RICHARD *et al.*: An Epidemiological Analysis of Canine-Biopsies Database Compiled by a Diagnostic Histopathology Service. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, p. 125-136, 2001.

SÁ & REPETTI: Carcinoma Inflamatória Mamário Canino – revisão de literatura. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 8-15, 2011.

SANDBERG *et al.*: Chromosomes Organization and Function, **Cancer Research**, v. 48, p. 1048-1059, 1988.

SARGAN, D. R.; MILNE, B. S.; AGUIRRE HERNANDEZ, J.; O'BRIEN, P. C. M.; FERGUNSON-SMITH, M. A.; HOATHER, T.; DOBSON, J. M. Chromosome Rearrangements in Canine Fibrosarcomas. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 7, p. 766-773, 2005.

SELDEN *et al.*: The Giemsa Banding Pattern of the Canine Karyotype. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 15, p. 380-387, 1975.

SHOFFNER *et al.*: Avian Chromosome Methodology. **Poult. Sci.**, v.46, p. 333-344, 1967.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

STONE *et al.*: The Giemsa Banding Pattern of Canine Chromosomes, Using a Cell Synchronization Technique. **Genome**, v. 34, p. 407-412, 1991.

STRANDBERG, J. D.; GOODMAN, D. G.: Animal Model of Human Disease. Breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 75, n. 1, p. 225-228, 1974.

SUMMER: **Chromosomes: Organization and Function**, Blackwell Publishing, 2003.

SWINTONSKY *et al.*: Report on the Progress of Standardization of G-band Canine Karyotype. **Chromosome Research**, v. 4, p. 306-309, 1996.

THOMAS *et al.*: Influence of Genetic Background on Tumor Karyotypes. **NCBI**, v. 17(3), p. 365-377, 2009.

TIJO; LEVAN: The Chromosome Number of Man, **Hereditas**, v. 46, p. 1-6, 1956.

VIDALES, G. T.; MOCHA, P. R. E.: Tumores mamários em caninos: adenocarcinoma complejo de glandula mamaria com metástasis a ganglio linfático regional. **Orinoquia**, Universidad de Los Llanos, Colombia, v. 11, n. 1, p. 99-110, 2007.

WEBB *et al.*: Cytogenetics of the Parthenogenetic *Grasshopper Warramaba vigo* its bisexual relatives. Chromosome Banding Studies, **Chromosoma**, v. 67, p. 309-339, 1978.

WICHMAN *et al.*: Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. **Journal of Heredity**, v. 82, p. 369-377, 1991.

WINKLER, S.; MURUA ESCOBAR, H.; EBERLE, N.; REIMANN-BERG, N.; NOLTE, I.; BULLERDIECK, J. Establishment of a Cell Line Derived from a Canine Prostate Carcinoma with a Highly Rearranged Karyotype. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 7, p. 782-785, 2005.

WINKLER, S.; REIMANN-BERG, N.; MURUA ESCOBAR, H.; LOESCHKE, S.; EBERLE, N.; HOINGHAUS, R.; NOLTE, I.; BULLERDIECK, J. Polysomia 13 in a Canine Prostate Carcinoma Underlining its Significance in the Development of Prostate Cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 169, p. 154-158, 2006.

WOLFE, L. G.; SMITH, B. B.; TOIVIO-KINNUCAN, M. A. SARTIN, E. A.; KWAPIEN, R. P.; HENDERSON, R. A. & BARNES, S.: Biologic Properties of Cell Lines Derived from Canine Mammary Carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 77, p. 783-790, 1986.

ZUCCARI *et al.*: Expressão dos Filamentos Intermediários no Diagnóstico dos Tumores Mamários de Cadelas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, 2002.

ZUCCARI *et al.*: Fisiopatologia da Neoplasia Mamária em Cadelas – Revisão. **Clinica Veterinária**, SP, n. 32, p. 50-53, 2001.

APÊNDICE

9 APÊNDICE

9.1 Questionário: neoplasia mamária canina

DATA: ____/____/____

Nº _____

1. IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

NOME: _____ ESPÉCIE: CANINA SEXO: FÊMEA

RAÇA: _____ IDADE: _____ COR: _____

IDENTIFICAÇÃO PROPRIETÁRIO

NOME: _____

END/TEL: _____

2. HISTÓRICO

CASTRAÇÃO SIM NÃO QUANDO: _____

USO DE ANTICONCEPCIONAL SIM NÃO

ORAL INJETÁVEL FREQUÊNCIA: _____

Nº DE PARTOS: _____ PSEUDOCIESE SIM NÃO

NEOPLASIAS SIM NÃO QUAL(IS): _____

OBSERVADO PELA 1ª VEZ EM _____

EVOLUÇÃO: RÁPIDA (< 6 M) INTERMEDIÁRIA (6 M A 1 A) LENTA (> 1 A)

3. AO EXAME

LOCALIZAÇÃO: _____ TAMANHO: _____

ÚNICO MÚLTIPLOS ULCERADO: SIM NÃO

CONSISTÊNCIA: NORMAL FIRME MOLE ADERENTE MÓVEL

ASPECTO/COR: _____

4. OUTRAS INFORMAÇÕES:

9.2 Encaminhamento material para histopatologia

DATA: ____/____/____

Nº _____

1. IDENTIFICAÇÃO ANIMAL

NOME: _____ ESPÉCIE: CANINA SEXO: FÊMEA

RAÇA: _____ IDADE: _____ COR: _____

IDENTIFICAÇÃO PROPRIETÁRIO

NOME: _____

END/TEL: _____

2. MATERIAL ENVIADO

BIÓPSIA/ EXÉRESE _____ MEIO DE CONSERVAÇÃO: FORMOL

ÓRGÃO ENVIADO: _____ TIPO DE LESÃO: _____

LOCALIZAÇÃO: _____ TAMANHO: _____

ÚNICO MÚLTIPLOS ULCERADO: SIM NÃO

CONSISTÊNCIA: NORMAL FIRME MOLE ADERENTE MÓVEL

ASPECTO/COR: _____

3. DADOS CLÍNICOS/ TRATAMENTOS

OBSERVADO PELA 1ª VEZ EM: _____

TRATAMENTOS: _____

DADOS CLÍNICOS: _____

4. SUSPEITA CLÍNICA:

VETERINÁRIO RESPONSÁVEL

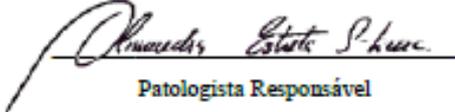
ANEXO

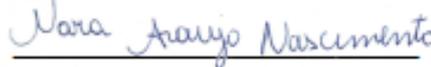
10. ANEXOS

10.1 Laudos histopatológicos

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Radja	Espécie: Canina	Raça: Indefinida	Sexo: Fêmea	Idade: 13 anos	RG: Não Informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M76/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não Informado	
Material Remetido: Blocos de parafina contendo fragmentos da mama inguinal direita.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia, coletado em 08/05/12.". Ao exame físico do animal, foi observado: "massa localizada na mama inguinal direita, não ulcerada".					
Macroscopia: Fragmento emblocado em parafina, identificado como B-212. Posteriormente, dia 31/08, recebido fragmento do tumor mamário conservado em álcool 70% e duas lâminas contendo um fragmento.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
B-212: Cortes histológicos de glândula mamária, nos quais se observam proliferação epitelial em arranjo predominantemente papilar, por vezes formando cordões e aglomerados celulares invadindo o estroma associado à proliferação de células mioepiteliais reativas, matriz mixóide, cartilagem e trabéculas ósseas, em sua maioria mineralizadas, circundando tecido mielóide bem diferenciado. Presença de estroma desenvolvido, índice mitótico baixo e extensa área de necrose.					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma em Tumor Misto.					
Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.					

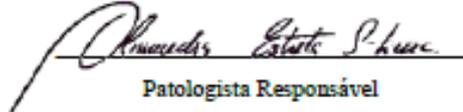
Salvador, 04 de Setembro de 2012.

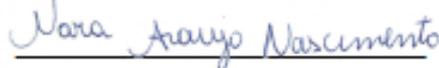

 Patologista Responsável
 Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
 Adjunto. Depto Patologia e Clínicas
 CRMV-BA 2354


 MV. Nara Araújo Nascimento
 Residente em Anatomia Patológica
 CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Rubi	Espécie: Canina	Raça: Rottweiler	Sexo: Fêmea	Idade: 7 anos	RG: Não Informado
Proprietário: Sra. Cintia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M77/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cintia Morais.				CRMV/BA: Não Informado	
Material Remetido: Blocos contendo fragmentos da mama abdominal direita.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia, coletado em 04/05/12.". Ao exame físico foi observado: "massa localizada na mama abdominal direita, firme, móvel e não ulcerada".					
Macroscopia: Fragmento embocado em parafina, identificado como B-211. Posteriormente, dia 31/08, recebido fragmento do tumor mamário conservado em álcool 70% e duas lâminas, cada uma contendo dois fragmentos.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
B-211: Secções histológicas de glândula mamária, revelando proliferação de células epiteliais arranjadas em túbulos e papilas, mas também, em aglomerados invadindo o estroma associado à proliferação e reatividade de células mioepiteliais produtoras de matriz mixóide.					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma em Tumor Misto.					
<i>Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.</i>					

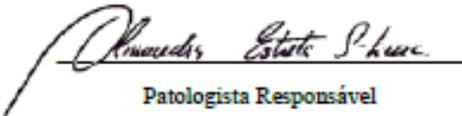
Salvador, 04 de Setembro de 2012.


 Patologista Responsável
 Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
 Adjunto . Depto Patologia e Clínicas
 CRMV-BA 2354

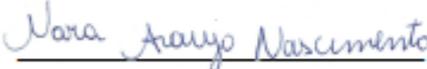

 MV. Nara Araújo Nascimento
 Residente em Anatomia Patológica
 CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Kaly	Espécie: Canina	Raça: Pinscher	Sexo: Fêmea	Idade: 12 anos	RG: Não Informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M78/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não informado	
Material Remetido: Blocos contendo fragmentos das mamas inguinais, direita e esquerda.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia, coletado em 25/04/12.". Ao exame físico foi observado: "massa localizada nas mamas inguinais, firme, móvel e não ulcerada".					
Macroscopia: Fragmentos emblocado em parafina, identificado como B-206 e 3UT2. Posteriormente, dia 31/08, recebido três fragmentos do tumor mamário conservado em álcool 70%; duas lâminas registradas como 3UT1, e mais duas lâminas designadas como 3UT2.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
B206/3UT1: Material em estado avançado de autólise, impossibilitando o diagnóstico mesmo que sugestivo desta lesão.					
B206/3UT2: Fragmentos histológicos de glândula mamária, nos quais se observam 1) proliferação epitelial em arranjo predominantemente papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. 2) Adjacente presença de proliferação papilar intraductal atípica. Havia ainda moderado infiltrado inflamatório multifocal mononuclear e áreas de necrose coagulativa.					
Diagnóstico Sugestivo: 1) Carcinoma Papilar 2) Carcinoma Papilar Ductal					
<i>Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.</i>					

Salvador, 04 de Setembro de 2012.


 Patologista Responsável

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
 Adjunto . Depto Patologia e Clínicas
 CRMV-BA 2354



MV. Nara Araújo Nascimento
 Residente em Anatomia Patológica
 CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Tika	Espécie: Canina	Raça: Pinscher	Sexo: Fêmea	Idade: 7 anos	RG: Não Informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M79/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				RG: Não Informado	
Material Remetido: Blocos contendo fragmentos das mamas inguinais.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia." Ao exame físico foram observados: "pequenos nódulos, localizados nas mamas inguinais de consistência firme, móveis; um dos nódulos apresentava-se ulcerado".					
Macroscopia: Fragmento emblocado em parafina, identificado como B-213 e 6UT2. Posteriormente, dia 31/08, recebido três fragmentos do tumor mamário conservado em álcool 70%; duas lâminas registradas contendo três fragmentos cada.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
B213/6UT2/F₁: Secções histológicas de glândula mamária, nas quais foi visualizada, proliferação epitelial bem diferenciada em arranjo papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. Presença de áreas focais de fibrose e intenso infiltrado inflamatório mononuclear de distribuição multifocal a difusa.					
Diagnóstico Sugestivo: Adenoma Papilar					
B213/6UT2/F₂: Cortes histológicos de glândula mamária, nos quais se observam proliferação epitelial bem diferenciada dispostas em túbulo e papilas.					
Diagnóstico Sugestivo: Adenoma túbulo-papilar.					

B213/6UT2/F3: Fragmentos histológicos de glândula mamária, revelando, em sua maior extensão, proliferação epitelial bem diferenciada em organização papilar, caracterizada por única ou dupla camada de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. Contudo, em área focal foram observadas papilas atípicas com aspecto carcinomatoso. Presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear de distribuição multifocal a difusa.

Diagnóstico Sugestivo: Adenoma Papilar com área focal de transformação carcinomatosa.

Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.

Salvador, 04 de Setembro de 2012.

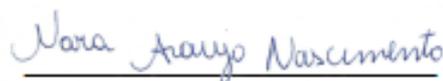


Patologista Responsável

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima

Adjunto . Depto Patologia e Clínicas

CRMV-BA 2354



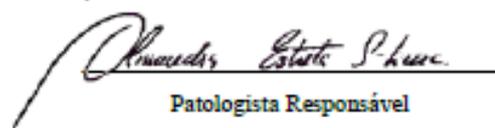
MV. Nara Araújo Nascimento

Residente em Anatomia Patológica

CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Sacha	Espécie: Canina	Raça: Poodle	Sexo: Fêmea	Idade: 14 anos	RG: Não informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M80/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não informado	
Material Remetido: Fragmentos da mama inguinal esquerda.					
Histórico Clínico: "Material proveniente de biópsia acondicionado em álcool 70% identificado como 10jt." Ao exame físico foi observado: massa localizada na mama inguinal esquerda, sólida, firme, aderente e ulcerada.					
Macroscopia: Recebido três fragmentos referidos como fragmentos de tumor mamário localizado em M ₃ E.					
F1: Medindo 2,4 x 0,5 x 1 cm; recoberto por pele íntegra, superfície de corte levemente irregular, branco-amarelada e consistência firme elástica.					
F2: Medindo 3,0 x 0,5 x 1,6 cm; superfície parcialmente recoberta por pele íntegra superfície de corte levemente irregular, branco-amarelada, consistência firme elástica.					
F3: Medindo 0,9 x 0,3 x 1,1 cm; superfície recoberta por pele, superfície de corte com presença de cavidades milimétricas, coloração branco-acinzentada e consistência firme elástica.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
M₃E: Em todos os fragmentos de glândula mamária analisada (F1, F2 e F3) foi observada proliferação de células epiteliais moderadamente pleomórficas, em arranjo predominantemente sólido associado à proliferação de células mioepiteliais reativas e atípicas produtoras de matriz mixóide e cartilagem constituída por condrócitos pleomórficos multinucleados. Índice mitótico baixo. Havia ainda intenso infiltrado inflamatório multifocal linfocitoplasmocitário com macrófagos contendo pigmento acastanhado no citoplasma (ceróide); áreas multifocais de metaplasia escamosa e presença de aglomerados celulares no interior de estruturas vasculares da derme (êmbolo neoplásico).					
Diagnóstico: Carcinossarcoma.					

Salvador, 04 de Setembro de 2012.



Patologista Responsável
 Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
 Adjunto I. Depto Patologia e Clínicas
 CRMV-BA 2354



MV. Nara Araújo Nascimento
 Residente em Anatomia Patológica
 CRMV-BA 3916

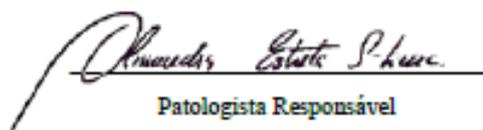
 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Chiquinha	Espécie: Canina	Raça: SRD	Sexo: Fêmea	Idade: 8 anos	R.G: Não informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M81/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não informado	
Material Remetido: Fragmentos da mama inguinal esquerda.					
Histórico Clínico: "Material proveniente de biópsia acondicionado em álcool 70º identificado como 09U-T."					
Macroscopia: Recebido três fragmentos referidos como fragmentos de tumor mamário.					
F1: Medindo 0,6 x 0,4 x 1,0 cm; recoberto por pele íntegra, superfície de corte brancacenta com áreas branco-amareladas, compacta e consistência firme elástica.					
F2: Medindo 0,9 x 0,7 x 0,4 cm; coloração brancacenta com áreas acastanhadas na periferia; ao corte apresenta superfície compacta, levemente irregular; consistência firme elástica.					
F3: Medindo 0,6 x 0,4 x 0,5 cm; coloração brancacenta; ao corte apresenta superfície irregular; consistência firme elástica.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
F1: Cortes histológicos de glândula mamária, revelando túbulos discretamente dilatados contendo substância eosinofílica amorfa associado a infiltrado moderado inflamatório mononuclear linfocítico focal peritubular.					
Diagnóstico Sugestivo: Glândula mamária em lactação.					
F2: Secções histológicas de glândula mamária, nas quais se observam proliferação epitelial, discretamente pleomórficas, formando papilas e algumas vezes túbulos associado à proliferação e reatividade de células mioepiteliais produtoras de matriz mixóide. Índice mitótico baixo. Havia ainda moderado infiltrado inflamatório multifocal mononuclear linfoplasmocitário e macrófagos contendo pigmento amarronzado no citoplasma (ceróide). Adjacente túbulos discretamente dilatados contendo substância eosinofílica amorfa (glândula mamária em lactação).					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma em Tumor Misto.					

F3: Fragmentos histológicos de glândula mamária, revelando proliferação epitelial em arranjo predominantemente papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais atípicas sustentadas por estroma fibrovascular. Índice mitótico baixo. Havia ainda discreto infiltrado inflamatório mononuclear e áreas de necrose coagulativa.

Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma Papilar.

Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.

Salvador, 04 de Setembro de 2012.

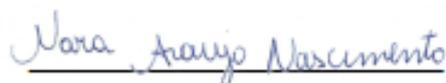


Patologista Responsável

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima

Adjunto . Depto Patologia e Clínicas

CRMV-BA 2354



MV. Nara Araújo Nascimento

Residente em Anatomia Patológica

CRMV-BA 3916

		HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>							
Nome do animal: Cindy		Espécie: Canina	Raça: Indefinida	Sexo: Fêmea	Idade: 9 anos	RG: Não Informado	
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (73) 9971-3359			
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M82/12			
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não Informado			
Material Remetido: Fragmentos de mama inguinal esquerda e direita.							
Histórico Clínico: "Material proveniente de biópsia acondicionado em álcool 70% identificado como 08U-T." Ao exame físico foi observado: "múltiplos nódulos, de consistência firme, móveis, não ulcerados".							
Macroscopia: Recebido quatro fragmentos referidos como fragmentos de tumor mamário localizado em M5, sem referência de lateralidade.							
F1: Medindo 2,1 x 0,7 x 0,7 cm; superfície levemente irregular, coloração brancacenta com áreas acastanhadas e consistência firme elástica. Ao corte apresenta superfície compacta de coloração brancacenta com áreas acastanhadas.							
F2: Medindo 2,0 x 0,9 x 1,0 cm; superfície levemente irregular, brancacenta, aparentemente revestida por cápsula; consistência firme elástica. Ao corte presença de cavidade medindo 0,8 x 0,7 cm, parede de superfície compacta, brancacenta com área acastanhada.							
F3: Medindo 2,0 x 0,8 x 0,8 cm; superfície irregular, coloração brancacenta, consistência firme elástica. Ao corte apresenta superfície compacta, coloração brancacenta e em sua maior extensão amarronzada.							
F4: Medindo 2,0 x 0,7 x 0,4 cm; superfície irregular, coloração brancacenta com áreas acastanhadas, consistência firme elástica. Ao corte, superfície compacta, coloração brancacenta com área acastanhada central.							

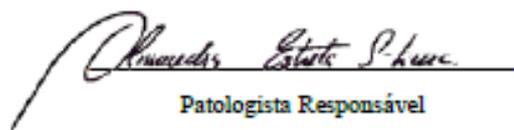
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);

F₁, F₂, F₃ e F₄: Secções histológicas de glândula mamária, revelando proliferação epitelial discretamente pleomórfica, dispostas predominantemente em arranjo papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. Associado presença de moderado infiltrado inflamatório multifocal linfocítico. Índice mitótico baixo. Em F₃ foram observadas áreas focais de necrose coagulativa. Em F₄, havia ainda, áreas focais de edema e necrose coagulativa.

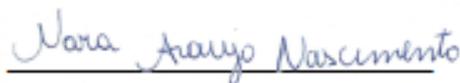
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma Papilar.

Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.

Salvador, 04 de Setembro de 2012.



Patologista Responsável
Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
Adjunto . Depto Patologia e Clínicas
CRMV-BA 2354



MV. Nara Araújo Nascimento
Residente em Anatomia Patológica
CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA					
LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP					
Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal: Shayla	Espécie: Canina	Raça: Pinscher	Sexo: Fêmea	Idade: 6 anos	RG: Não Informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (073) 9971-3359	
Data de entrada: 22/08/2012				Nº LABAP: M83/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não Informado	
Material Remetido: Fragmentos de mama inguinal direita.					
Histórico Clínico: "Material proveniente de biópsia acondicionado em álcool 70° identificado como 07U-T." Ao exame físico foi observado: massa localizada na mama inguinal direita, consistência firme e não ulcerada.					
Macroscopia: Recebido três fragmentos referidos como fragmentos de tumor mamário localizado em M5D.					
F₁: Medindo 1,3 x 0,7 x 0,6 cm; superfície irregular, e coloração brancacenta com áreas enegrecidas e alaranjadas, consistência firme elástica. Ao corte apresenta superfície compacta, coloração branco-amarelada com áreas brancacentas, amarronzadas e alaranjadas.					
F₂: Medindo 1,4 x 0,7 x 0,4 cm; superfície recoberta por pele e consistência firme elástica. Ao corte apresenta superfície compacta de coloração brancacenta com áreas amarronzada.					
F₃: Medindo 0,6 x 0,3 x 0,3 cm; superfície irregular; coloração brancacenta e consistência firme elástica.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
F₁: Secções histológicas de glândula mamária, nas quais se observam proliferação epitelial atípica, apresentando discreto pleomorfismo, e disposição predominantemente papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. Índice mitótico baixo. Havia ainda moderado infiltrado inflamatório multifocal mononuclear.					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma Papilar.					

F₂: Cortes histológicos de glândula mamária, nos quais se observa proliferação de unidades lobulares compostas por células epiteliais bem diferenciadas.

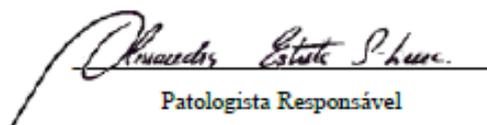
Diagnóstico Sugestivo: Hiperplasia lobular.

F₃: Fragmentos de glândula mamária, revelando formação nodular encapsulada caracterizada pela proliferação de células mioepiteliais reativas produtoras de matriz condróide associado à discreta proliferação epitelial bem diferenciada em arranjo tubular.

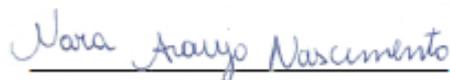
Diagnóstico Sugestivo: Tumor Misto Benigno.

Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.

Salvador, 04 de Setembro de 2012.


Patologista Responsável

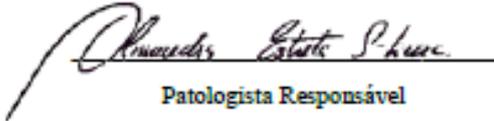
Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
Adjunto Depto Patologia e Clínicas
CRMV-BA 2354

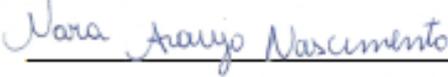


MV. Nara Araújo Nascimento
Residente em Anatomia Patológica
CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 - Ondina 40170-110 - Bahia - Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal:	Espécie:	Raça:	Sexo:	Idade:	RG:
Sissi	Não Informada	Não Informada	Não Informado	Não Informada	Não Informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (073) 9971-3359	
Data de entrada: 31/08/2012				Nº LABAP: M90/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não Informado	
Material Remetido: Lâminas de secções histológicas de glândula mamária.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia."					
Macroscopia: Recebido um (01) fragmento de tumor mamário acondicionado em álcool 70%, identificado como B-203; um bloco e uma lâmina contendo um fragmento.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E).					
B-203: Secções histológicas de glândula mamária, nas quais se observam proliferação epitelial atípica, apresentando discreto pleomorfismo e arranjo predominantemente papilar, caracterizada por múltiplas camadas de células epiteliais sustentadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo. Índice mitótico baixo. Havia ainda intenso infiltrado inflamatório multifocal mononuclear, áreas de necrose coagulativa e alterações circulatórias como congestão e hemorragia.					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma Papilar					
<i>Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.</i>					

Salvador, 04 de Setembro de 2012.


 Patologista Responsável
 Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
 Adjunto. Depto Patologia e Clínicas
 CRMV-BA 2354


 MV. Nara Araújo Nascimento
 Residente em Anatomia Patológica
 CRMV-BA 3916

 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA "PROF. RENATO MEDEIROS NETTO" - UFBA LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - LABAP Av. Adhemar de Barros, 500 – Ondina 40170-110 – Bahia – Brasil Tel: (71) 3283-6739 					
<u>RESULTADO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO</u>					
Nome do animal:	Espécie:	Raça:	Sexo:	Idade:	RG:
Laiza	Não informada	Não informada	Não informado	Não informada	Não informado
Proprietário: Sra. Cíntia Morais				Telefone: (073) 9971-3359	
Data de entrada: 31/08/2012				Nº LABAP: M91/12	
Médico Veterinário Responsável: Dra. Cíntia Morais.				CRMV/BA: Não Informado	
Material Remetido: Lâminas de secções histológicas de glândula mamária.					
Histórico Clínico: "Solicito exame histopatológico de material proveniente de biópsia."					
Macroscopia: Recebido cinco (05) fragmentos do tumor mamário acondicionado em álcool 70% identificado como B-202; um bloco e uma lâmina com dois fragmentos identificados como 1ª amostra; um bloco e uma lâmina com três fragmentos identificados como 2ª amostra.					
Microscopia: * Todos os fragmentos histológicos analisados foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (H-E);					
1ª Amostra: Secções histológicas de glândula mamária, nas quais se observam proliferação epitelial discretamente pleomórfica formando túbulos (alguns apresentando proliferação intraluminal atípica - Carcinoma "in situ"), papilas cordões e aglomerados invadindo o estroma associado à proliferação e reatividade de células mioepiteliais. Índice mitótico baixo. Havia ainda discretos focos de infiltrado inflamatório mononuclear predominantemente linfocítico.					
Diagnóstico Sugestivo: Carcinoma Complexo.					
2ª Amostra: Cortes histológicos de glândula mamária, revelando 1) proliferação epitelial discretamente pleomórfica formando papilas e túbulos (alguns apresentando proliferação intraluminal atípica - Carcinoma "in situ") associados à proliferação e reatividade de células mioepiteliais produtoras de matriz mixóide. Índice mitótico baixo. Adjacente 2) dilatação de ducto mamário contendo proliferação epitelial bem diferenciada em disposição papilar.					
Diagnóstico Sugestivo: 1) Carcinoma em Tumor Misto e 2) Papiloma Ductal					

Obs.: Devido ao avançado estado de autólise do material analisado, fato previamente informado a solicitante, foi possível obter apenas o diagnóstico sugestivo da lesão.

Salvador, 04 de Setembro de 2012.



Patologista Responsável

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima

Adjunto. Depto Patologia e Clínicas

CRMV-BA 2354



MV. Nara Araújo Nascimento

Residente em Anatomia Patológica

CRMV-BA 3916