

USO DA TÉCNICA DE MICROARRANJO TECIDUAL NA CLASSIFICAÇÃO DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS CANINAS NORMAIS E NEOPLÁSICAS

Hugo Henrique FERREIRA, Denise Caroline TOLEDO, Veridiana Maria Brianezi
Dignani de MOURA

Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, hugo.hen@hotmail.com, denisinhatoledo@hotmail.com,
dvmoura@vet.ufg.br

INTRODUÇÃO

Neoplasias mamárias representam 52% dos tumores das fêmeas caninas e aproximadamente 50% desses são malignos (RUTTEMAN et al. 2001). Acometem em maior frequência cadelas não castradas (SILVA et al., 2004) e as com idade entre sete e 12 anos (RUTTEMAN et al. 2001). Em 60% dos casos ocorrem neofomações sincrônicas em mais de uma mama (BENJAMIN et al., 1999), e cada tumor pode apresentar diversos tipos histológicos. Entre os malignos, os carcinomas complexos e os simples de padrão tubulopapilar são os mais diagnosticados e, entre os benignos, o adenoma simples e o tumor misto benigno (FILHO et al., 2010).

O diagnóstico de neoplasia mamária pode ser realizado inicialmente pela citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), que permite a diferenciação de processos inflamatórios e outros tumorais que podem ocorrer próximos às mamas, como lipoma ou mastocitoma (DALECK et al., 2009). Apesar disso, a confirmação e a classificação devem ser realizadas ao exame histopatológico (MISDORP et al., 1999), que fornece informações importantes sobre a natureza e o tipo histológico, bem como sobre a extensão e infiltração da lesão (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Embora a avaliação histológica defina o diagnóstico, a imuno-histoquímica pode ser determinante como método auxiliar na classificação de tumores indiferenciados (DALECK et al., 2009). Além disso, tem sido usada para avaliar marcadores protéicos no tecido neoplásico, que são apontados como determinantes no comportamento biológico do tumor e, em alguns casos, propostos como ferramenta auxiliar na determinação de prognóstico (HIRAYAMA et al., 2002). Como o método é relativamente caro, a técnica de microarranjo tecidual (*Tissue microarray* - TMA) tem sido utilizada para reduzir custos, principalmente em pesquisas. Esta é baseada na construção de um bloco de parafina com fragmentos cilíndricos de amostras teciduais obtidas de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais.

Dessa forma, o uso da imuno-histoquímica para conhecer a expressão de um determinado marcador pode ocorrer em uma lâmina de TMA com centenas de amostras ao custo de uma única reação (ANDRADE et al., 2007). Este trabalho teve como objetivo avaliar e classificar as amostras mamárias normais e neoplásicas a partir de lâminas confeccionadas pela técnica de TMA.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionaram-se amostras de tecido mamário canino normal e neoplásico, de cadelas adultas e sem restrição quanto à raça, nos arquivos do Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, e do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Dos blocos com as amostras de tecido mamário normal e neoplásico foram obtidos cortes de 3 μ m, estes distendidos sobre lâminas histológicas e corados por Hematoxilina e Eosina (HE), para a avaliação histomorfológica e classificação das neoplasias. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, inicialmente em menor aumento (32x), seguindo-se aos aumentos subseqüentes (100x, 250x e 400x). Na análise foram selecionadas 15 amostras de tecido mamário normal (Grupo 1), 15 de adenoma simples (Grupo 2), 15 de carcinoma simples tubulopapilar (Grupo 3) e 15 de carcinoma complexo de glândula mamária (Grupo 4), totalizando 60 amostras de mama canina.

Nas lâminas referentes as 60 amostras escolhidas foram selecionadas e marcadas 120 áreas representativas de tecido mamário normal e de cada tipo tumoral (carcinoma complexo, carcinoma simples, adenoma simples). Em seguida, as áreas marcadas foram identificadas nos blocos doadores, dos quais foram obtidos cilindros de 2mm de diâmetro e transferidos para o bloco receptor (TMA). Para a confecção do bloco de TMA foi utilizado o equipamento *Tissue MicroArray builder* 20010.2, Histopathology Ltd, Hungary. Do bloco de TMA foi confeccionado um corte de 3 μ m, este distendido sobre lâmina histológica e corado por HE, para avaliação e confirmação da presença de áreas morfológicas representativas das lesões originais. Uma amostra de placenta normal foi inserida no bloco de TMA para a orientação do mesmo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos problemas da utilização da técnica de TMA no presente estudo foi a perda de fragmentos teciduais durante a coloração de rotina. Acerca disso, ALMEIDA et al. (2008), comparando diferentes técnicas que promovem a aderência do corte à lâmina histológica, concluíram que a silanização das lâminas, apesar de não se mostrar estatisticamente mais eficiente que as demais técnicas, pode ser viável em pesquisas em função da praticidade e do custo reduzido. Ressalte-se que nesta pesquisa não foram empregadas técnicas como a silanização das lâminas, mas, para evitar prejuízos com a perda de fragmentos, das sessenta amostras selecionadas foram obtidas duas áreas representativas de cada. De outra parte, ANDRADE et al. (2007) referem que a maior preocupação dos críticos na utilização do TMA é a representação da lesão, considerando a pequena amostra estudada. Apesar disso, neste estudo, o tamanho de 2mm foi suficiente para a representação e a classificação do tecido mamário normal e neoplásico.

Nas últimas décadas, diversos métodos de classificação histológica têm sido propostos para os tumores mamários caninos (FOWLER et al., 1974; MISDORP, 1999). A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda é a mais aceita pelos patologistas veterinários (MISDORP, 1999). Entretanto, um estudo mais recente propôs um novo padrão de classificação, em que tipos e subtipos histológicos foram incorporados, baseados em descrições recentes de tumores com características morfológicas distintas àquelas das classificações anteriores (GOLDSCHMID et al., 2011). Neste estudo, como não foram considerados tumores mamários referentes aos tipos incorporados pela recente classificação, optou-se por utilizar o padrão histológico proposto pela OMS, já que a exceção das formas adicionadas, as demais são semelhantes em ambas as metodologias de categorização tumoral.

O carcinoma tubulopapilar correspondeu àqueles onde se notou proliferação maligna de células epiteliais em formações tubulares e projeções papilares, com escasso tecido estromal. Na classificação proposta por FOWLER et al. (1974), os tumores com formações tubulares e papilares eram classificados em subtipos distintos, sendo denominados adenocarcinoma tubular ou adenocarcinoma papilar. Todos os tumores deste estudo apresentaram formações tubulares e papilares, enquadrando nas classificações mais recentes, que unem os dois

subtipos, denominando carcinoma simples do tipo tubulopapilar (MISDORP, 1999; GOLDSCHMID et al.,2011).

Os adenomas simples eram tumores caracterizados por formação nodular, bem delimitada e não infiltrativa, com células arranjadas em túbulos e ocasionalmente com secreção de coloração anfófila. Estas características microscópicas, na nomenclatura preconizada por FOWLER et al. (1974) representavam o adenoma. Sabe-se que os adenomas podem estar associados à proliferação mioepitelial ou fibroblástica acentuadas, não se enquadrando em nenhum tumor descrito por estes autores. Assim, neste caso, as classificações propostas por MISDORP (1999) e GOLDSCHMID et al. (2011) são mais coerentes, tendo em vista que consideram a possibilidade de adenomas simples e complexos.

Os carcinomas complexos eram aqueles morfologicamente compostos por proliferação maligna de células epiteliais e proliferação benigna de células mioepiteliais. Todos os métodos de classificação são consensuais quanto a este tipo tumoral. Na classificação descrita por FOWLER et al. (1974), todos os adenocarcinomas, do tipo tubular, papilar ou papilar cístico, apresentavam respectiva subclassificação complexa. Apesar disso, os tumores complexos, como se sabe, apresentam diferenças significativas quanto ao prognóstico. Portanto, as classificações propostas por MISDORP (1999) e GOLDSCHMID et al. (2011), são mais específicas, visto que incorporaram a referida característica ao tipo tumoral.

Assim como descrito por CUNNINGHAM (2004), a glândula mamária normal foi caracterizada por múltiplas formações acinares revestidas por células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas e circundadas por células mioepiteliais e estroma fibrocolagenoso.

CONCLUSÃO

A técnica de TMA se mostrou eficiente na representatividade e classificação dos tumores mamários caninos. Apesar da diferença sutil entre os métodos de classificação histológica para os tumores mamários, os recentes são mais adequados e específicos na descrição e categorização dos tumores avaliados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.S.; COSTA, H.O.; LIMA, F.O.; JUNIOR, N.P.; OSHIMA, C.T.F.; GOMES, T.S.; FRANCO, M. Perda de amostras em *tissue microarray*: comparação

entre técnicas com uso de fita adesiva comercial, lâminas silanizadas pelo método tradicional ou por método modificado. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 44, n. 5, p. 359-365, 2008.

ANDRADE, V.P.; CUNHA, I.W.; SILVA, E.M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S.S.; NASCIMENTO, C.F.; SOARES, F.A. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.1, p. 55-60, 2007.

BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C. & SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, Basel, v.36, p.423-436, 1990.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clinica Veterinária**, São Paulo, n.61, p. 56-64, 2006.

CUNNINGHAM, J. G. A glândula mamária. In: **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.417-430.

DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B. & RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2009. 612p.

FILHO, J. C. O.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.2, p.177-185, 2010.

FOWLER, E. H.; WILSON, G. P.; KOESTER, A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenic classification. **Veterinary Pathology**, Washington, v.11, p.212-229, 1974.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**. Washington: v. 48, n.1, p. 117-131, 2011.

HIRAYAMA, K.; YOKOTAY, H.; ONAI, R.; KOBAYASHIY, T.; KUMATAY, T.; KIHARA, K.; OKAMOTO, M.; SAKO, T.; NAKADEZ, T.; IZUMISAWAZ, Y.; TANIYAMA, H. Detection of Matrix Metalloproteinases in Canine Mammary Tumours: Analysis by Immunohistochemistry and Zymography. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v.127, p.249-256, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide reference on Comparative Oncology, 1999. p.1-59.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. & MACEWEN E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S.J. & MACEWEN E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed.: Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.455-477.

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