

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**NAIANNE REZENDE GONÇALVES**

**MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO AGNOR E SUA RELAÇÃO COM TIPO E  
GRAU HISTOLÓGICO EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

**Uberlândia – MG  
Novembro 2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**NAIANNE REZENDE GONÇALVES**

**MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO AGNOR E SUA RELAÇÃO COM TIPO E  
GRAU HISTOLÓGICO EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Trabalho de conclusão de curso para  
obtenção do título de graduação em  
Medicina Veterinária na Universidade  
Federal de Uberlândia – UFU

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Alessandra  
Aparecida Medeiros

**Uberlândia – MG**

**Novembro 2018**

**NAIANNE REZENDE GONÇALVES**

**MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO AGNOR E SUA RELAÇÃO COM TIPO E GRAU HISTOLÓGICO EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS**

Trabalho de conclusão de curso para  
obtenção do título de graduação em  
Medicina Veterinária na Universidade  
Federal de Uberlândia – UFU

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professora Doutora Alessandra Aparecida Medeiros Ronchi

---

Professor Matias Pablo Juan Sazabó

---

Professora Mestranda Lígia Fernandes Gundim

## **Agradecimentos**

Agradeço a DEUS em primeiro lugar que me iluminou meu caminho dando força e saúde para seguir em frente superando as dificuldades.

Agradeço à minha mãe, a minha irmã e aos meus primos que me ajudaram me apoiando para nunca desistir e chegar até essa etapa da minha vida.

Ao meu pai, que onde quer que esteja, sei que me fortalece e me guia.

Agradeço a minha orientadora pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão, pelo aprendizado e principalmente pela paciência e tempo no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos que me incentivam desde os primeiros dias na faculdade.

Enfim, o meu muito obrigado a todas as pessoas que fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida.

## **Resumo**

As neoplasias mamárias em cadelas são de importância significativa em medicina veterinária, devido à alta frequência, sendo modelo de estudo para o câncer de mama em humanos. Com diferentes padrões histológicos e comportamento biológico, torna essa doença mais complexa e urgente a sua identificação por fatores de prognóstico, possibilitando diagnosticar e tratar com eficiência os animais portadores de neoplasias mamárias. Os marcadores de proliferação, estão presentes nos tumores, no sangue ou em líquidos biológicos, podendo alterar concentrações relacionadas ao crescimento celular tumoral, levando, nos últimos anos, a intensificação dos estudos para identificar marcadores celulares que ocorrem durante a evolução neoplásica. Com isso, nesse trabalho objetivou-se avaliar a técnica de imunohistoquímica do marcador de proliferação AgNOR com o tipo e com o grau histológico das cadelas que foram atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, de janeiro a maio de 2017

**Palavra chave:** cão, tumor mamário, proliferação celular.

## **Abstract:**

Mammary neoplasms in female dogs are of significant importance in veterinary medicine due to the high frequency, being a study model for mammary cancer in humans. With different histological patterns and biological behavior, it makes this disease more complex and urgent to be identified by prognostic factors, making it possible to diagnose and treat effectively the animals with mammary neoplasms. Proliferation markers are present in tumors, blood or biological fluids, and may alter concentrations related to tumor cell growth, leading in recent years to the intensification of studies to identify cell markers that occur during neoplastic evolution. Thereby, the objective of this study was to evaluate the immunohistochemical technique of the AgNOR proliferation marker with the type and histological grade of the female dogs that were treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Uberlândia from January to May 2017.

**Key words:** dog, breast tumor, cell proliferation.

## SUMARIO:

1. INTRODUÇÃO .....	07
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	08
2.1 Morfologia das Glândulas Mamárias nas Cadelas .....	08
2.2 Neoplasias Mamárias em Cadelas .....	09
2.3 Marcadores de Proliferação Celular .....	12
2.4 AgNOR .....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
REFERÊNCIAS .....	21

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias em cadelas são frequentes, principalmente em cadelas não castradas, sendo que os tumores de mama compreendem 50% a 70% de todos neoplasmas que acometem esses animais (MOE, 2001), sendo assim uma enfermidade muito importante na espécie canina devido a alta taxa de mortalidade e morbidade nestes animais (ZUCCARI et al., 2008).

Estudos realizados em vários países indicaram que 41% a 53% dos tumores mamários na cadela são malignos, e dentre eles, 90% são carcinomas (GAMBA et al., 2017). MISDORP (2002) afirma que é o tipo histológico o fator principal no prognóstico dos tumores de mama.

De acordo com ZUCCARI et al. (2001), os tumores malignos tem desenvolvimento rápido, e entre os critérios de malignidade mais observados estão os tumores com células epiteliais atípicas e os com células pleomórficas. Segundo alguns autores a graduação histológica é atribuível ao grau de malignidade, para corresponder a um tumor, os parâmetros de avaliação são a formação de túbulos, a presença de núcleos com tamanhos diferentes (anisocariose) e número de mitoses por campo (objetiva de 40X) (BLOOM & RICHARDSON, 1957).

Fatores de prognóstico são definidos como uma ou várias características clínicas, patológicas e biológicas dos indivíduos e dos seus tumores que podem ser utilizadas para prever a evolução clínica de cada caso e também o tempo de sobrevida do animal (FERREIRA et al., 2017). Dentre os fatores de prognóstico estabelecidos para tumores mamários em cadelas estão estágio clínico, tamanho tumoral (ITO et al., 1996), grau histológico (HUGHES, DOBSON, 2012), taxa de mitose (HUGHES, DOBSON, 2012) e invasão de linfonodos e vasos (SEIXAS et al., 2011).

A técnica AgNOR (Regiões Nucleolares Organizadas coradas pela Prata [Ag]) tem sido utilizada em patologia oncológica para avaliação da agressividade de tumores malignos e do seu prognóstico (DERENZINI, 2000), sendo que a atividade proliferativa da célula é representada pelo aumento das AgNOR's, refletindo o estágio de mitose (MELLO, ALVES, 1999).

SARLI et al. (2002) avaliaram o papel do marcador de proliferação AgNOR em tumores mamários em cadelas e verificaram que altas taxas de proliferação celular estavam relacionadas a maior progressão da doença, confirmando o valor prognóstico do AgNOR.

Considerando a importância dos tumores mamários na rotina médico veterinária, além do fato das neoplasias mamárias nas cadelas servirem de modelo para o estudo de tumores mamários em mulheres (JESEN-JAROLIM et al., 2015), esse trabalho teve como objetivo avaliar a relação do marcador de proliferação celular AgNOR com o tipo e grau histológico tumoral.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Morfologia das Glândulas Mamárias nas Cadelas**

As cadelas apresentam cinco pares de glândulas mamárias: torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais, (ZUCCARI et al., 2002) que possuem a mesma estrutura formadas por lóbulos separadas por septos conjuntivos onde drenam para os canais secretores calibrosos, os denominados ductos lactíferos, estes se abrem nos mamilos em números variados (ZUCCARI et al., 2002; MURPHY, 2008).

O seio lactífero encontra-se antes dos ductos, que são dilatações ampolares formadas pelos ductos (BANKS, 1993). O epitélio de revestimento dos ductos, antes de se ramificarem são de dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas e à medida que vão se ramificando se transformam em simples cúbico ou cilíndrico, para formar os ductulos intralobulares (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

Os alvéolos dessas glândulas são formados por epitélio cilíndrico simples, que sintetiza e secreta proteínas lácteas e lipídeos durante a lactação (PELETEIRO, 1994). Os ductos e os alvéolos são circundados por células mioepiteliais contratáteis, semelhantes a fibras musculares lisas, que sobre a influência da ocitocina e se contraí secretando o leite (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

A comunicação linfática é feita pelas glândulas abdominais craniais e torácicas caudais, as abdominais craniais são as únicas que drenam simultaneamente para o linfonodo axilar acessório e para o inguinal superficial porém todas as mamas tem drenagem independente para o linfonodo próximo a elas (RASOTTO et al., 2011).

Durante a vida do animal a glândula mamária sofre diferenciação em seu desenvolvimento em estágios (NOGUEIRA; CASTRO, 2017). Quando a fêmea está no estágio impúbere, a glândula é formada por um sistema tubular ramificado rudimentar conectados aos ductos lactíferos (PEÑA et al., 2014) que sobre o efeito do estrógeno, na puberdade se

desenvolve aumentando discretamente por células adiposas, e com a progesterona atuando sobre as glândulas e no tipo de ciclo estral, que determina a ação prolongada desse hormônio durante o metaestro, retornando ao seu nível basal dias após o início do estro (SORENMO et al., 2011).

Nas cadelas gestantes, a progesterona promove proliferação de células epiteliais da porção final dos ductos lactíferos, que irá desenvolver as glândulas mamárias. De forma subsequente forma-se os alvéolos secretores formados por epitélio cilíndrico simples com entremeado de células mioepiteliais. Durante a fase de lactação, junto com vários outros hormônios, os ductos e os alvéolos secretores ficam distendidos, alguns cheios e outros vazios de leite, e ao fim da lactação a maioria desses alvéolos são reabsorvidos e o volume da mama diminuí (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

Então, as glândulas mamárias vão se diferenciar e evoluirão repetidas vezes em cada ciclo, tendo modificações na organização do tecido glandular e modificações fisiológicas levando ao desenvolvimento desse tecido, especialmente na região epitelial, que leva a alterações neoplásicas diversas (SORENMO et al., 2011).

## **2.2 Neoplasias Mamárias em Cadelas**

As neoplasias mamárias são comumente diagnosticadas em cadelas (GOLDSCHMIDT et al., 2017). Fêmeas entre 7 a 12 anos de idade e com o envolvimento de uma ou mais de uma glândula mamária é a apresentação clássica deste tipo de neoplasia (VARALLO et al., 2012).

Segundo LANA et al. (2007), a idade do animal e a probabilidade de desenvolvimento de tumores mamários variam numa razão direta, sendo que a idade média de manifestação tumoral, nas cadelas, ocorre por volta dos 10 e os 11 anos, sendo rara em idades inferiores a 4 anos. Do mesmo modo, MISDORP (2002) relata que as neoplasias mamárias ocorrem com maior frequência em cadelas adultas a idosas, entre 9 e 11 anos de idade e que não foram castradas, sendo menos frequente em animais com menos de 5 anos de idade.

Além disso, todas as raças podem ser afetadas, incluindo animais sem raça definida (ROCHA; TOSTES, 2005). A predisposição racial ainda não está clara, mais já foi observado um maior surgimento em vários exemplares das raças Spaniel e em alguns estudos também no Caniche e Dachshund (RUTTEMAN et al., 2001). Outros autores apontam para uma maior incidência no Poodle, Retrievers, Spaniel inglês, Setter inglês, Pointer, Cocker Spaniel, Fox

Terrier e Terrier de Boston (MITCHELL et al., 1974; RUTTEMAN et al., 2001; MEUTEN, 2002). Curiosamente, os animais das raças Boxer e Beagle são referidos como aqueles que apresentam menor risco de desenvolverem tumores de mama (WITHROW; MACEWEN, 1996; QUEIROGA; LOPES, 2002). A incidência também é baixa em raças mestiças quando comparadas às raças puras (DE NARDI et al., 2008), sendo as principais raças acometidas: Poodle, Pastor Alemão, Cocker Spaniel e cães sem raça definida (DE NARDI et al., 2009).

Segundo NUNES et al. (2017), as mamas mais acometidas são as inguinais e as abdominais caudais, provavelmente ao maior parênquima nessas mamas e a atividade proliferativa de respostas ao estrógeno.

Vários fatores são indicados como predisponentes para o desenvolvimento neoplásico e estes incluem a idade, dieta, influência hormonal e predisposição genética (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Estrógeno, progesterona e o hormônio do crescimento são hormônios que influenciam na formação desses tumores (NUNES et al., 2017) e a influência hormonal pode ser comprovada a partir do efeito protetor da castração precoce em cadelas. O risco de aparecimento desse tumor nas cadelas castradas antes do primeiro cio é de 0,05%, 8% após o primeiro cio, e após o segundo o risco aumenta para 26% (SCHNEIDER et al., 1969). Tratamentos com anticoncepcionais também podem aumentar o risco do desenvolvimento desses tumores (NUNES, 2017).

Quanto à morfologia, as neoplasias mamárias podem se apresentar como nódulos pequenos ou grandes, aderidos ou móveis, únicos ou múltiplos, ulcerados, circunscritos, dependendo do comportamento biológico do tumor (COUTO, 2010; JASCKSTET, 2013; GRANDI, 2017). Em relação à mobilidade, podem ser móveis ou aderidos, com envolvimento cutâneo e muscular. Ao corte, podem ter aspecto sólido, cístico ou misto, com possíveis focos de necrose (RUTTEMAN et al., 2001).

Microscopicamente, as células podem variar de populações de células epiteliais, mioepiteliais e/ou mesenquimais, com formato colunar, cuboide, ou com formato fusiforme e dendrítico, e os núcleos redondos a ovais com cromatina fina e um nucléolo evidente e pequenos. O tumor pode apresentar contagem mitótica aumentada, de duas ou mais células em mitose por campo, podendo exibir necrose em pequenas áreas multifocais ou em grande área central, presença de células inflamatórias no tecido conectivo ou intraneoplásico, sendo comum a invasão de vasos linfáticos e veias (GRANDI, 2017).

SORENMO (2003) correlacionou o tipo tumoral, a diferenciação histológica e outros fatores de prognóstico com o risco de disseminação. Em geral, a metástase dos tumores epiteliais ocorre pela circulação linfática que carrega células neoplásicas para linfonodos regionais e depois para os pulmões, enquanto os tumores de origem mesenquimal são disseminados pela via hematogênica indo diretamente para os pulmões (SORENMO, 2003). Sendo assim, os principais órgãos acometidos pelas metástases são os linfonodos regionais, principalmente os inguinais e os axilares, e os pulmões, e com menor frequência rins, fígado, baço, pele, adrenais, encéfalo, olhos, esqueleto (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; PIEKARZ, 2007), além de coração, rins, pele, cérebro e ossos (DE NARDI et al., 2009; KLOPFLEISCH & GRUBER, 2009).

Propostas de classificação para as neoplasias mamárias têm sido descritas a fim de contribuir com a avaliação prognóstica, já que por vezes o subtipo histológico demonstra-se correlacionado a uma pior sobrevida (SOLANO-GALLEGO, 2012; RASOTTO et al., 2017).

Ao longo dos anos, essa classificação tem sido aprimorada a fim de facilitar sua aplicação. Em 1974, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira classificação histológica internacional de tumores dos animais domésticos, incluindo neoplasias e displasias da glândula mamária, baseada nas classificações propostas em três estudos anteriores (MISDORP et al., 1971; MISDORP et al., 1972; MISDORP et al., 1973) sofrendo modificações posteriores, baseadas em MISDORP et al. (1999).

Em 2011, baseado na classificação para a OMS realizada por MISDORP et al. (1999), uma proposta de classificação das neoplasias mamárias foi realizada por CASSALI et al. (2011), sendo reavaliada em 2013 (CASSALI et al., 2013). Ainda, GOLDSCHMIDT et al. (2011) também propuseram classificação para as neoplasias mamárias baseada na classificação da OMS de 1974 e 1999, sendo as neoplasias primariamente divididas em: epitelial maligna, tipos especiais de neoplasia epitelial maligna, mesenquimais malignas, mista maligna, hiperplasia/displasia, neoplasias do teto e hiperplasia ou displasia do teto (melanose) (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Atualmente, GOLDSCHMIDT et al. (2017) classifica as alterações mamárias caninas em hiperplasia/displasia, neoplasias benignas (adenoma – simples e complexo, adenoma ductal, fibroadenoma, mioepitelioma e tumor misto benigno) e malignas (epiteliais, mesenquimais e mistas – epiteliais e mesenquimais). As neoplasias mamárias epiteliais malignas são as mais frequentes, podendo ser citadas dentre elas o carcinoma *in situ*, carcinoma simples (tubular, tubulopapilar, cístico-papilar e cribiforme), complexo,

micropapilar, sólido, comedocarcinoma, anaplásico, em tumor misto, mioepitelioma maligno, ductal, intraductal.

### **2.3 Marcadores de Proliferação Celular**

A identificação de marcadores moleculares que estão envolvidos em eventos celulares durante a carcinogênese de tumores de mama em cadelas, como diferenciação e crescimento celular, proliferação, invasão e metástase tem sido motivo de estudos em oncologia veterinária (ZUCCARI et al., 2008; RAKHA et al., 2009).

Estes marcadores permitem a distinção do comportamento biológico do tumor, podendo fornecer informações sobre grau de malignidade, presença ou não de metástase, taxa de progressão tumoral, resposta à terapias e a sobrevida do paciente (PAPAIOANNOU et al., 2009).

A proliferação celular de tumores relaciona-se com o prognóstico, sendo considerada como inversamente proporcional à sobrevida de pacientes com neoplasias mamárias, principalmente carcinomas (FERREIRA et al., 2017).

O Ki-67 é um dos marcadores de proliferação celular mais estudados (ZUCCARI, 2004). Segundo BROWN E GATTER (1990) o Ki-67 é um antígeno nuclear presente em todas as fases ativas do ciclo celular, sendo uma proteína não histona expressa nas fases ativas do ciclo celular como a fase G1, na fase S e na mitose (exceto na fase G0) (ZUCCARI, 2004). Tumores positivos ao Ki-67 são correlacionados a prognóstico ruim (BARBOSA et al., 2003).

PEÑA et al. (2014) relataram que o aumento da expressão do Ki-67 além de correlação positiva para metástases, tem também correlação positiva para mortes pelo tumor e menor tempo de sobrevida (FERREIRA et al., 2017). FREYTAG (2017) também demonstraram que cadelas com neoplasias com valores elevados de Ki-67 tem maior probabilidade de óbito.

Outro marcador de proliferação celular é o PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), que é uma proteína nuclear não histônica, atuando como co-fator de DNA polimerase delta e sua presença é observada no ciclo celular no final da fase G1, com pico na fase S e declínio na fase G2 e M (MIGHELL, 1995).

### **2.4 AgNOR**

É um método de contagem da região organizadora nucleolar (NOR), que pode demonstrar a atividade proliferativa de tumores malignos (MARTIN, 1994). Essas NORs são

regiões de cromatina fracamente coradas em torno das quais, no fim da telófase, nucléolos são reformados após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula. As NORs contêm genes ribossômicos que codificam RNA ribossomal (rRNA) (GALL E PARDUE, 1969), que estão ativos em nucléolos (PLOTON, 1994).

Um grupo peculiar de proteínas ácidas que são altamente argirófilas estão localizadas nos mesmos locais que as NORs, permitindo assim que as NORs sejam muito claramente e rapidamente visualizadas por procedimentos de coloração por nitrato de prata (GOODPASTURE e BLOOM, 1975).

As regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs), nas células eucarióticas, são definidas como proteínas ácidas não-histonas localizadas próximas a segmentos cromossômicos nos quais o rRNA é codificado (RÜSCHOFF et al., 1989).

SARLI et al. (2002) disseram que uma elevada sensibilidade prognostica do índice AgNOR pode ser pela quantidade de AgNOR em interfase que está relacionada com a taxa de duplicação celular, ou seja, quanto mais rápida a proliferação celular, maior é a quantidade de AgNOR em interfase.

No cão, as AgNORs estão exclusivamente localizadas nas regiões teloméricas dos cromossomos 7, 8, 27 e algumas vezes no 38 (KOPP et al., 1982). As regiões análogas no núcleo interfásico podem ser facilmente demonstradas usando o mesmo processo de coloração pela prata (RÜSCHOFF et al., 1989).

Para prever o desfecho clínico de tumores mais agressivos o AgNOR é útil, porque ele relaciona elevados valores de taxa de proliferação celular com a progressão rápida das neoplasias mamárias em cadelas (SARLI et al., 2002).

À microscopia óptica, as AgNORs apresentam-se como pontos escuros bem definidos, medindo de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em número e formas variáveis, primariamente no nucléolo, e também como “satélites” no núcleo. Nas células em interfase os pontos estão distribuídos exclusivamente através do nucléolo corado (AUBELE et al., 1994). Cada grânulo de AgNOR pode ser considerado como uma unidade transcricionalmente ativa (PLOTON, 1994).

A avaliação das AgNORs pode ser feita através de contagem, mensuração de sua área e análise de sua distribuição no núcleo (RÜSCHOFF et al., 1994).

Sob ponto de vista estatístico, as células cancerígenas têm uma quantidade AgNORs em interfase que células benignas ou normais e, portanto, uma lesão maligna pode frequentemente ser distinguida de uma lesão benigna do mesmo tecido pela avaliação quantitativa de interfase AgNOR (DERENZINI, 2000).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Seleção dos animais do estudo**

Foram selecionadas cadelas, de variadas raças e idades, castradas ou não, que foram encaminhadas voluntariamente para atendimento clínico-cirúrgico no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de janeiro a maio de 2017.

Após avaliação clínica e conforme recomendação médico veterinária, as cadelas foram submetidas a tratamento cirúrgico pelas técnicas de mastectomia unilateral ou bilateral total, com retirada dos linfonodos regionais.

#### **Processamento das amostras dos carcinomas**

Imediatamente após a excisão cirúrgica, a cadeia mamária foi enviada ao Laboratório de Patologia da UFU e submetida à palpação para identificação de nódulos palpáveis, que foram mensurados com auxílio de paquímetro (Zaas®) e classificados de acordo com o tamanho em T1 (< 3 cm), T2 (de 3 a 5 cm) e T3 (> 5 cm). Em seguida foram coletadas amostras das mamas afetadas por nódulos ou massas palpáveis e armazenada separadamente em frasco com solução de formol 10% tamponado.

O processamento das amostras para confecção das lâminas será realizado segundo TOLOSA et al. (2003) e secções histológicas de 4µm serão coradas pela técnica de HE.

O diagnóstico foi realizado em estudo duplo cego por dois patologistas segundo GOLDSCHMIDT et al. (2017). O grau histológico foi atribuído de acordo com o sistema Nottingham modificado por ELSTON e ELLIS (1991).

#### **AgNOR**

A contagem de AgNOR foi realizada em cortes histológicos (5µm) corados de acordo com a técnica preconizada por VALDOVOCH et al. (2004). As regiões organizadoras nucleolares argirofílicas foram identificadas como grânulos pretos ou marrom-escuros presentes no interior do núcleo das células neoplásicas. Para a quantificação das AgNORs foi realizada a contagem direta à microscopia ótica dos grânulos argentafins no interior dos

núcleos. Foram selecionados cinco campos representativos e aleatórios em aumento de 1000x, procedendo-se a contagem dos grânulos em 100 células neoplásicas (20 células cada campo). A frequência individual em cada neoplasma foi obtida dividindo-se o número total de grânulos contados por 100. A contagem foi realizada por dois observadores, em momentos distintos, em estudo duplo cego.

### **Análise estatística**

Para a análise dos AgNORs, os dados foram confrontados utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics, sendo considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram selecionadas 50 cadelas portadoras de neoplasias mamárias, com idade média de 9,71 anos, variando de 4 a 15 anos de idade. ANDRADE et al. (2017) relataram média de idade de 9,99 anos em cadelas com tumor de mama (incluindo tumores benignos e malignos), sendo que a média foi de 9,66 anos para cadelas com tumores benignos e 10,07 para aquelas com tumores malignos. Estes autores também verificaram que os tumores foram mais frequentes em animais idosos (55,3%) do que em animais adultos (44,3%). Para SARLI et al. (2002), relatou que a média de idade foi de 10,01 anos das cadelas com tumores mamários, e no estudo de LOHR et al. (1997) a média de idade dos cães foi de 9,05 anos. Mas no presente estudo não houve uma relação entre o tipo histológico e seu grau com as variáveis idades.

Com relação às raças, a maioria das cadelas era sem raça definida (SRD) (40%), seguido pela raça Poodle (26%), as outras raças não tiveram frequência relevante. O mesmo foi encontrado em ANDRADE et al. (2017), com a prevalência de 39,56% de SRD e o Poodle de 33,4%. Já para SARLI et al. (2002), separou em raças mestiças (33,33%) e raças puras (63,33%), e duas raças não conhecidas, sendo que as raças mestiças também teve alta frequência de tumores mamários em cadelas. E também em PASCOLI et al. (2017) as cadelas SRD foram as mais acometidas com tumores mamários (29,41%,  $n=5/17$ ), seguidas pela raça Poodle (17,64, 3/17). Mas neste no presente estudo, não houve relação entre raça e o tipo histológico.

**Tabela 1** – Frequência de cadelas com tumores mamários de acordo com a raça e tipo histológico.

<i>Raça</i>	
SRD	20 (40%)
Poodle	13 (26%)
Pinscher	4 (8%)
Shihtzu	4 (8%)
Basset	2 (4%)
Ni	2 (4%)
Maltes	1 (2%)
Rottweil	1 (2%)
Pitibull	1 (2%)
Cocker	1 (2%)
Golden	1 (2%)
<i>Tipo histológico</i>	
<i>Malignos</i>	
Carcinoma complexo	16 (32%)
Carcinoma tubulopapilar	10 (20%)
Carcinoma em tumor misto	9 (18%)
Carcinoma solido	5 (10%)
Carcinoma tubular	2 (4%)
Carcinoma micropapilar	2 (4%)
<i>Benignos</i>	
Tumor misto benigno	3 (6%)
Adenoma complexo	2 (4%)
Adenoma simples	1 (2%)

Tabela 2 – Frequência de Graduação Histológica dos Tumores Mamários.

<i>Grau histológico</i>	
I	19 (43%)
II	23 (52%)
III	2 (5%)

Das 50 amostras, em relação aos tumores malignos, o tipo histológico mais frequente foi Carcinoma Complexo (32% - 16/50) seguido por Carcinoma Tubulopapilar (20% - 10/50) o Carcinoma em Tumor Misto também teve frequência alta (18% - 9/50). Dentre os carcinomas em cães, os mais comuns são os Tubulopapilares (MISDORP, 2002), já para BRATULIC et al. (1996) o mais frequente são os Carcinomas Tubulares e para ANDRADE et al., foram os Carcinomas Simples, o qual não foi presenciado neste estudo. E observou-se que o Carcinoma Complexo foi o mais frequente no presente estudo, como revela a Tabela 1 relacionada com a raça.

Com relação ao grau histológico dos tumores, foram analisados em 44 tumores mamários, onde 52% (23/44) era do grau II, 43% (19/44) do grau I e 5% (2/44) do grau III (Tabela 2). Foi observado no estudo feito por MENDES (2014), que a maior frequência do grau histológico nos tumores de mama o de grau I (40%), seguido pelo grau III (15%) e por último o grau II (10%), revelou uma diferença do presente estudo onde os carcinomas de grau II foi o mais frequente. Em SARLI et al. (2002), o grau com maior frequência era o de grau I (55%) seguido pelo grau II (16,66%), não tendo nenhum caso do grau III, também diferente deste estudo. Já em outro estudo, o grau que mais predominou foi o II, com 45% dos casos, seguidos do grau I de apenas 30%, mostrando uma semelhança com o que foi coletado neste estudo. Correspondendo assim a natureza invasiva desses tumores malignos, em que pelo menos um linfonodo regional tenha apresentado a presença ou ausência de metástases, mais neste estudo os linfonodos regionais não foram recolhidos para exame histopatológico. Entre as variáveis clínicas e histológicas, o grau histológico demonstra valores inquestionáveis no prognóstico de tumores de mama (PÉREZ et al., 1995).

Segundo PICH et al. e TRERE et al. (2004), a avaliação de quantidade de AgNOR contados nos núcleos das células é a única ferramenta na obtenção de informações da biogênese ribossomal em preparações citohistológicas. No presente estudo, das 50 amostras de tumor mamário, 23 foram avaliadas de acordo com AgNOR, onde houve a contagem dos

nucléolos fragmentados dos núcleos das células neoplásicas, e revelou em algumas das lâminas excelente qualidade de coloração, aparecendo pontos pretos a amarronzados claros, de diferentes formas e tamanhos, dispersos no fundo nuclear claro (Figura 1 e 2).

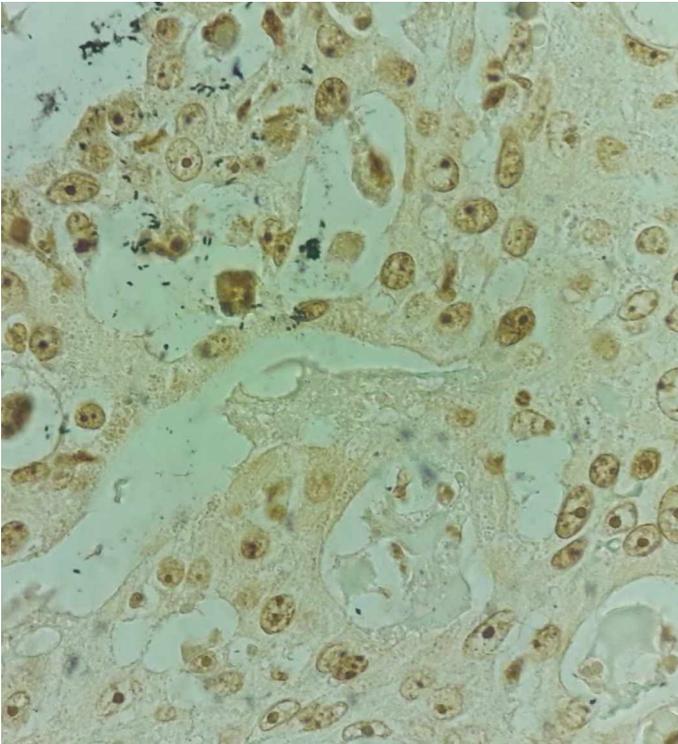


Figura 1: Coloração AgNOR, com nucléolos corados pela prata. Autoria Propria.

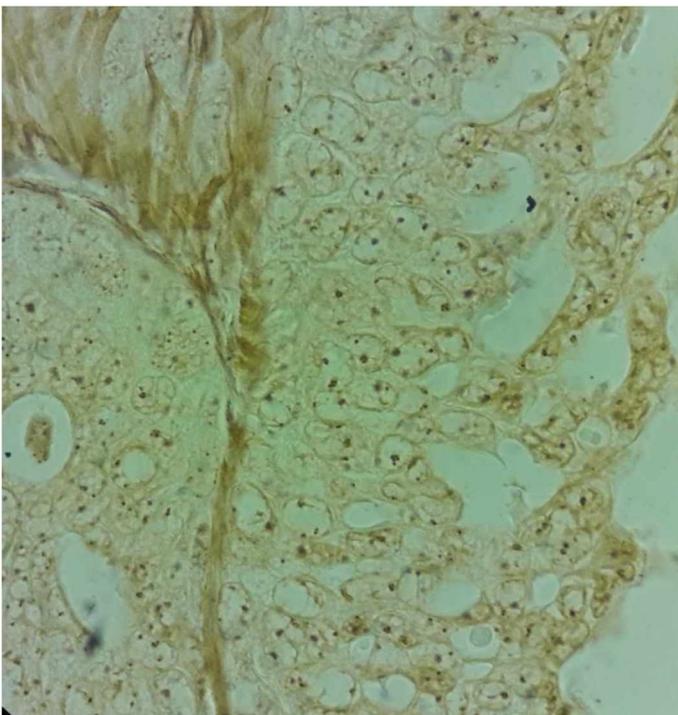


Figura 2: Coloração AgNOR

A contagem média de AgNOR para todos os tumores individuais variou de 5,4 a 1,66 por núcleo e relacionado com o diagnóstico histológico (Tabela 3), essa contagem poderia ser correlacionada com o aumento do grau de malignidade com elevadas contagens de AgNOR, mas devido a não leitura de todas as lâminas, fica difícil chegar a essa conclusão. Mas em relação as neoplasias benignas, que era esperado, todas as contagens foram baixas.

**Tabela 3** – Correlação entre diagnóstico histopatológico e região organizadora nucleolar (AgNOR) para as cadelas com neoplasias mamárias.

<b>Diagnóstico Histológico</b>	<b>Número de cães em Grupo</b>	<b>Média de Contagem de AgNOR por Núcleo</b>
Carcinoma em tumor misto	9	5,54
Carcinoma complexo	16	3,61
Carcinoma micropapilar	2	3,9
Carcinoma tubulopapilar	10	4,32
Carinoma solido	5	3,44
Carcinoma tubular	2	3,62
Adenoma simples	1	2,8
Adenoma compelho	2	0
Tumor misto benigno	1	1,66
<b>Total</b>	<b>50</b>	

Essa NORs coram com nitrato de prata por causa da presença de altas concentrações de proteínas associadas ao enxofre em locais de montagem de RNA ribossomal (r RNA) correlacionado com a taxa de proliferação celular (BOSTOCK et al., 1992). Neste estudo, as

contagens foram feitas por observação direta em microscópio (objetiva 100X), o tempo da coloração deve ser controlado, devido sua importância, mas podendo ser devido exposição curta à solução de nitrato de prata ou por superexpansão das proteínas coradas, neste trabalho levaram algumas lâminas a uma coloração pálida e de outras houve produção de grande depósito de corante, nessas observaram o AgNOR de forma individual, devido a vários nucléolos corados dentro de uma célula. Em seu trabalho, DZIMIRA et al. (2005), concluíram que essa coloração de prata das NORs, além de simples é um método barato, com a confirmação de baixa ou alta malignidade em exames de histopatologia.

Neste trabalho houve diferenças nas contagens das médias dos tumores mamários que foram corados pelo AgNOR, que segundo VALDOVICH et al. (2004), podem ser devido a diferenças no tempo de processamento das lâminas, pela concentração de pH da formalina, pelo procedimento de desparafinação e reidratação, pelo fixador, devido ao tempo para a preparação da solução de prata, pelo tempo dessa coloração e pela eficácia da lavagem, levando a redução do número de AgNORs individuais visíveis e formação de excesso de precipitado de prata, complicando a análise.

BOSTOCK et al., (1992) afirmaram que as contagens de AgNOR pode fornecer um método útil de avaliar malignidade. Porém BRATULIC et al. (1996) mostraram em seu estudo que os AgNORs não parecem ter um valor de prognóstico para determinação de tumores malignos de mama e que possam levar a metástases distantes, mas se usados corretamente a classificação histopatológica pode ser um índice confiável de malignidade. SARLI et al. (2002), correlaciona a sensibilidade prognóstica do índice AgNOR com a invasidade histológica, devido a quantidade de AgNOR em interfase relacionada com taxa de proliferação celular, porque quanto mais rápida essa proliferação maior é a quantidade de AgNOR em interfase.

LOHR et al. (1997), confirmaram que um elevado impacto de diagnóstico histopatológico na experiência realizada em seu estudo, levou a uma estimativa crucial de prognóstico, sobrevida, tempo de vida e reaparecimento tumoral. E SARLI et al. (2002), confirmaram que é de grande importância as informações fornecidas pela graduação histológica e pelo índice AgNOR, prevendo resultados pós-cirúrgicos nos tumores mamários malignos.

Com isso, este estudo leva a conclusão que não houve significância nem para tipo e nem para a graduação histológica das 23 lâminas que foram concluídas e contadas os AgNORs, mas poderia ter chegado a um resultado significativo se todas as 50 amostras coletadas pudessem ter corado e os AgNORs contados sem erros e que a correlação de malignidade não está correta daquelas observadas em outros estudos.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. B.; GUIMARÃES, E. C.; COLETO, A. F.; SOARES, N., P. & MEDEIROS-RONCHI, A. A. Estudo Retrospectivo de Lesões Mamárias em Cadelas – Uberlândia, MG, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 45: 1509, 2017.

AUBELE, M.; BIESTERFELD, S.; DERENXINI, M; HUFNAGL, P.; MARTIM, H.; OFNER, D.; PLOTON, D.; RUSHOFF, J. Guidelines of AgNOR quantitation. Committee on AgNOR quantitation within the European Society of Pathology. **Zentralbl. Pathol.** Jena, v. 140, p. 107-108, 1994.

BANKS, W.J. (1993). Integumentary system. In **W.J. Banks** (Ed.) Applied veterinary histology (3rd Ed.). U.S.A: Mosby.

BARBOSA, T. V.; ROSAS, M. P.; COSTA, A. C.; RAPOPORT, A. Valor prognóstico do KI-97 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 629-634, 2003.

BLOOM, H. J. G. & RICHARDSON, W. W. Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer. **Journal of Cancer**. 11, 359-377, 1957.

BOSTOCK, D. E., MORIARTY, J.; CROCKER, J. Correlation Between Histologic Diagnosis mean Nuclear Organizer Region Count and Prognosis in Canine Mammary Tumors. **Vet Pathol** 29:381-385, 1992.

BRATULIC, M.; GRABAREVIC, Z.; ARTUKOVIC, B.; CAPAK, D. Number of Nucleoli and Nucleolar Organizer Regions per Nucleus and Nucleolus – Pognostic Value in Canine Mammary Tumors. **Vet Pathol**. 33: 527-532, 1996.

BROWN, D. C & GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**.17: 489-503, 1990.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n.2, p. 153-180, 2011.

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

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, Ano XI, n. 61, março /abril, p. 56-64, 2006.

COUTO, C. G. Medicina interna de pequenos animais. 4. Ed Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. in: C. R. DALECK, A. B. DE NARDI, S. RODASKI – *Oncologia em Cães e Gatos* – p. 317- 381 - São Paulo: Ed. Roca, 2008.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In. DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009. Cap.25, p. 372-383.

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

DZIMIRA, S.; MADEJ, J. A.; NOMAK, M. studies on nucleolar organiser regions (AgNORs) in selected spontaneous and transplantable animal tumors. **Plo J Vet Sci** v. 8, p.127 – 135, 2005.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

FERREIRA, E., CAMPOS, M. R. A., NAKAGAKI, K. Y. R., CASSALI, G. D. Marcadores Prognóstico e Preditivos no Câncer de Mama. In. **Patologia Mamária Canina do Diagnóstico ao Tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 141-149.

FITZGIBBONS P.L., PAGE D.L., WEAVER D., THOR A.D., ALLRED C., CLARK G.M., RUBY S.G., O'MALLEY F., SIMPSON J.F., CONNOLLY J.L., HAYES D.F., EDGE S.B., LICHTER A., SCHNITT S.J. Prognostic Factors in Breast Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.124, p.966-978, 2000.

FREYTAG, J.O. Valor Prognóstico de Marcadores Imunohistoquímicos em Mastocitomas Cutâneos Caninos. São Paulo, 2017.

GAMBA, C. O., FERREIRA, E., SALGADO, B. S., DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., NAKAGAKI, K. Y. R., CASSALI, G. D. Neoplasias Malignas. In. CASSALI, G. D. **Patologia Mamária Canina do Diagnóstico ao Tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 91-116.

GALL, J.G., PARDUE, M.L., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 64, 600–604.

GOLDSCHMIDT M., PEÑA L., RASOTTO R. & ZAPPULLI V., 2011. **Classification and grading of canine mammary tumors**. *Vet Pathol*, 48, 117– 131.

GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. Wiley Blackwell, p.723-765, 2017.

GOODPASTURE, C., BLOOM, S.E., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 20, 37–50.

GRANDI, F. Citopatologia Mamária: Técnicas de Amostragem, Interpretação e Classificação Citopatológica. In: CASSALI, G. D. **Patologia Mamária Canina do Diagnóstico ao Tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 33-59.

ITO, T. et. al. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, 58 (8): 723-726, 1996.

JASCKSTET, V. Marcadores prognóstico em tumores mamários de cadelas – Revisão de Literatura. 2013. 36 f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

JENSEN-JAROLIM, E., FAZEKAS, J., SINGER, J., HOFSTETTER, G., OIDA, K., MATSUDA, H., TANAKA, A. Crosstalk of carcino embryonic antigen and transforming growth factor- $\beta$  via their receptors: comparing human and canine cancer. **Cancer Immunol Immunother, Heidelberg**, v. 64, p.531–537, 2015.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBER, A. D. Differential expression. Of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal 503 mammary glands. **Research in Veterinary Science**, Roma, v. 87, n.1, p. 91-96, 2009.

KOPP, E.; MAYR, B.; SCHILEGER, W. Nucleolar organizer regions on chromosomes of the domestic dog. **J. Hered.**, Cary, v. 73, n.1, p. 73, 1982.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J.; MacEwen, E. G. (Ed). **Small Animal Clinical Oncology**. 4 ed. Missouri: WB Saunders, 2007. p. 619–633.

LORH, C. V.; TEIFKE, J. P.; FAILING, K.; WEISS, E. Characterization of the Proliferation State in Canine Mammary Tumors by the Standardized AgNOR Method with Postfixation and Immunohistologic Detection of Ki-67 and PCNA. **Vet Pathol** 34: 212-221, 1997.

MARTIN, H. The importance of the AgNOR analysis in malignant tumors. **Zentralbl. Pathol.** 140: 15-22, 1994.

MELLO, E. S. & ALVES, V. A. F. Marcadores de Proliferação Celular In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. Manual de Imuno- histoquímica Editora Sociedade Brasileira de Patologia São Paulo 1999, p.182 - 194.

MENDES, A. R. Avaliação da Quimioterapia Metronômica em Carcinomas Maários de Cadelas por Imunomarcações. Araçatuba, SP. 2014.

MEUTEN, D. J. *Tumors in domestic animals*. 4 ed. Iowa State: Univ. California, 2002. p. 788.

MITCHELL, L.; DE, L. A.; IGLESIA, F. A.; WENKOFF, M. S. Mammary tumors in dogs survey of clinical and pathological characteristics. *Canad Vet J*. v. 15, n. 5, p. 131-138, 1974.

MIGHELL A. PCNA and p53. **Oral Oncol Eur J Cancer**, 1995; 31B:403- 4.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F.; JABARA, A. G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumors: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 447-470, 1972.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F.; JABARA, A. G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. **Veterinary Pathology**, 10: 241-256, 1973.

MISDORP, W. 2002. Tumors of the Mammary Gland. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Iowa State Press, pp.575-606.

MISDORP, W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

MOE, L. (2001) Population-based incidence of mammary tumours in some dogs breeds. **J Reprod Fertil Suppl** 57:439-443.

MURPHY, S. Mammary tumors in dog and cats, In practice, London, v. 30, p. 334-339, 2008.

NOGUEIRA, J. C.; CASTRO, A. C. S. Morfologia das glândulas mamárias (Mammae) de Cadelas. In. CASSALI, G. D. **Patologia Mamária Canina do Diagnóstico ao Tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p.01-13.

NUNES, F. C., DE CAMPOS, C. B., BERTAGNOLI, A. C. Aspectos Epidemiológicos das Neoplasias Mamárias Caninas. In. CASSALI, G. D. **Patologia Mamária Canina do Diagnóstico ao Tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 27-31.

PAPANOIANNOU, N.; PSALLA, D.; ZAVLARIS, M.; LOUKOPOULOS, P.; TZIRIS, N.; VLEMMAS, I. Immunohistochemical expression of dogTERT in canine testicular tumours in relation to PCNA, Ki67 and p53 expression. **Vet. Res.**, v. 33, p. 905- 919, 2009.

PASCOLI, A. L.; NEGRÃO, S. L.; OLIVEIRA, L. E.; FERREIRA, M. G. P. A.; REIS FILHO, N. P.; DE NARDI, A. B. Campanha de Orientação, Prevenção e Diagnóstico Precoce de Tumores Mamários em Cadelas e Prevalência desses Tumores Diagnosticados Durante a

Campanha Realizada no Município de Blumenau – SC. **Archives of Veterinary Science**. v. 22, n. 2, p. 66 – 00, 2017.

PELETEIRO, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, LXXXIX(509), 10-34.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GARTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V. & MULAS, J. Canine mammary tumors: A review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PÉREZ, M. D. A.; RUTTEMAN, G. R.; KUIPERS, N. J. D. et al. DNA Flow Cytometry of Canine Mammary Tumors: The Relationship of DNA Ploidy and S-phase Fraction to Clinical and Histological Features. **Res Vet Sci** 58: 238-234, 1995.

PICH, A.; CHIUS A, L; NAVONE, R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. **Annals of Oncology** v. 15, p.1319 – 1329, 2004.

PIEKARZ, H. C. Expressão da E-caderina no prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas. 2007. **Dissertação (mestrado)**, Universidade Federal do Paraná UFPR- Curitiba.

PLOTON, D. Structure and molecular organization of the nucleolus. **Zentralbl. Pathol.** Jena, v. 140, n. 1; p. 3-6, 1994.

QUEIROGA & LOPES F. & LOPES C. 2002. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 97, p.119-27.

RAKHA, E. A. et al. Pathobiological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 113, n. 3, p. 411-422, 2009.

RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. H. A retrospective study os those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 49, p. 330-340, 2011.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54 (4), p, 571-578, 2017.

ROCHA, N. S.; TOSTES, R. A. Diagnóstico comparativo entre citologia aspirativa por agulha fina e avaliação histopatológica da glândula mamária de cadelas. *Colloquium Agrariae*, v. 1, n. 2, p. 38-42, 2005.

RUSCHOFF, J.; PLATE, K.; BITTINGER, A.; THOMAS, C. Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. **Pathol. Res Pract.** 185:878-885, 1989.

RUSCHOFF, J.; FAUSER, G. KNUCHEL, R. HOFSTADTER, F. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. **Zentralbl. Pathol.** Jena, v. 140, n. 1, p 23-30, 1994.

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 Company, 2001. p. 455-477.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI G.; MARCATO, P. S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **J Vet Diagn Invest** 14:25-34, 2002.

SCHNEIRDER, R. et al. Factors influencing canine mammary cancer development and post surgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249-1261, 1969.

SEIXAS, F., PALMEIRA, C., PIRES, M. A., BENTO, M. J., LOPES, C. 2011. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. **Veterinary Journal**, 187(1): 65-71.

SOLANO-GALLEGO, L. Sistema reprodutivo. In: RASKIN, R. E; MEYER, D. J. **Citologia clínica de cães e gatos – Atlas colorido e guia de interpretação.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, p. 274-281.

SORENMO, KU, RASOTTO, R., ZAPPULLI, V. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Vet Pathol.** 2011;48:85–97.

THERÈ, D.; CECCARELLI, C.; MONTANARO, L.; TOSTI, E.; DERENZINI, M. Nucleolar size and activity are related to pRb status in human breast cancer. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** v. 52, p.1601 – 1607, 2004.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. *Barueri.* 2. Ed. Barueri: editora manole, 2003. 331p.

VALDOVICH, P.; PSÁDER, R.; TÓTIL, Z. A.; PERGE, E. Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. **Veterinary Pathology.** v. 41, p.338 – 345, 2004.

VARALLO, G. R.; RAPOSO, T. M. M.; TERRA, E. M.; COSTA, M. T.; DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias: idade ao diagnóstico, raça e cadeia mamária mais acometida em cadelas atendidas no HV da UNESP, Jaboticabal, SP. In: *Oncovet*, 7, 2012, João Pessoa. **Anais do VII Oncovet**, 2012. p. 20-22.

WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Small Animal Clinical Oncology*. 3 ed. Philadelphia: Saunders, p. 455-467, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Expressão dos filamentos intermediários do diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 586-591, 2002.

ZUCCARI, D. A. P. C., SANTANA, A. E., CURY, P. M., CORDEIRO, J. A. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Vet Clin Pathol** 2004;33(1):23-8.

ZUCCARI, D. A.P.C., BERTON, C.R., TERZIAN, A. C. B., RUIZ, C. M. Fatores de Prognósticos e Preditivos nas Neoplasias Mamárias: Importância dos Marcadores Imuno-histoquímicos nas Espécies Humana e Canina – Estudo Comparativo. **Arq Ciências Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189-198, 2008.