

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

A CARIOMETRIA COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES NEUROENDÓCRINOS
PANCREÁTICOS EM FURÕES (*Mustela putorius furo*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

MICHELLY GONÇALVES BARBOZA

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

A CARIOMETRIA COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES NEUROENDÓCRINOS
PANCREÁTICOS EM FURÕES (*Mustela putorius furo*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

MICHELLY GONÇALVES BARBOZA

São Paulo

2018

Barboza, Michelly Gonçalves.

A cariometria como ferramenta no diagnóstico diferencial de tumores neuroendócrinos pancreáticos em furões (*Mustela putorius furo*) / Michelly Gonçalves Barboza. - 2018.

22 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Biologia da Diferenciação e Transformação Celular: Modulação por Fatores Endógenos e Exógenos.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Cariometria. 2. pNETs. 3. Histopatologia. 4. Furões I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

MICHELLY GONÇALVES BARBOZA

**A CARIOMETRIA COMO FERRAMENTA NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES NEUROENDÓCRINOS
PANCREÁTICOS EM FURÕES (*Mustela putorius furo*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Eliana Reiko Matushima
Universidade de São Paulo – USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante essa caminhada, me dando forças e saúde para vencer todos os obstáculos, sem ele não conseguiria alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais Ginaldo Barboza e Girlane Barboza que desde muito cedo me ensinaram o valor do estudo, meu marido Ismael Messias pelo apoio nos momentos de dificuldades, pela compreensão durante os períodos que precisei me ausentar, pelo carinho e pela confiança durante esta trajetória.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela sua competência, presteza e incentivo com que sempre me orientou e que tornaram possível a conclusão desse Mestrado.

A todos os professores e colegas que participaram do meu desenvolvimento, meus sinceros agradecimentos.

A cariometria como ferramenta no diagnóstico diferencial de tumores neuroendócrinos pancreáticos em furões (*Mustela putorius furo*)

Barboza M.G¹; Silva L.S¹; Mouriño J. P²; Xavier J. G¹,

[Cariometry as a tool in differential diagnosis in pancreatic neuroendocrine tumors of ferrets (*Mustela putorius furo*).] Pesquisa Veterinária Brasileira. Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, Avenida José Maria Whitaker 290, Vila Clementino, São Paulo, SP, 04057-000, Brasil; E-mail: xavier2126@gmail.com

ABSTRACT: The neuroendocrine tumors constitute a heterogeneous group of rare neoplasms derived from cells of the neuroendocrine system, and may have benign or malignant behavior. Neuroendocrine tumors of the pancreas (pNETs) are among the most common and, despite scientific and technological advances, are still diagnosed late, a fact that makes it impossible to adopt a more effective therapeutic approach, determining a high mortality rate related to pNETs. In contrast to that reported in other species, such neoplasms are frequent in gonadectomized ferrets, placing them as a potential model in comparative pathology, potentially useful for understanding the biology of these conditions. In the present study, the relationship between the histopathological classification and the nuclear pattern of neoplastic cells was evaluated, considering adenomas and carcinomas of the endocrine pancreas. For these 9 pNETs, they were classified histopathologically, being 3 benign and 6 malignant. Digitized images of the slices were obtained with the use of the OPTICAM® photomicroscope, from 4 large magnification fields (40x) per formation. In each formation 200 cells were measured, from the manual delimitation of its nucleus, with the aid of the cursor. Using the Metamorph® software, a morphometric evaluation was performed considering the nuclear area and perimeter measurements. In the mean, the nuclei of carcinomatous cells had higher values when compared to those of adenomatous cells ($p < 0.0001$, Student's t-test, unpaired). These findings indicate the adequacy of the use of morphological parameters in the classification of pNETs in ferrets and show an analogy with the condition in humans, in which cariometry is also useful in distinguishing between benign and malignant lesions.

INDEX TERMS: Cariometry. pancreatic neuroendocrine tumors. Ferrets.

1Recebido em _____

Aceito para publicação em _____

1 Pós graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, Avenida José Maria Whitaker, 290, Vila Clementino, São Paulo, 04057-000, Brasil. Pesquisa de mestrado. Autor para correspondência: xavier2126@gmail.com

2 Clínico veterinário autônomo

Resumo: Os tumores neuroendócrinos constituem um grupo heterogêneo de neoplasias raras derivadas de células do sistema neuroendócrino podendo ter comportamento benigno ou maligno. Os tumores neuroendócrinos do pâncreas (pNETs) estão entre os mais comuns e, apesar dos avanços científicos e tecnológicos, ainda são diagnosticados tardiamente, fato que impossibilita uma abordagem terapêutica mais eficaz, determinando uma alta taxa de mortalidade relacionada aos pNETs. Em contraposição ao relatado em outras espécies, tais neoplasias são frequentes em furões gonadectomizados, situando-os como um potencial modelo em patologia comparada, potencialmente útil para a compreensão da biologia dessas condições. No presente estudo foi avaliada a relação entre a classificação histopatológica e o padrão nuclear das células neoplásicas, considerando-se adenomas e carcinomas de pâncreas endócrino. Para tanto, nove pNETs, foram classificados histopatologicamente, sendo três benignos e seis malignos. Imagens digitalizadas dos cortes foram obtidas com o uso do fotomicroscópio OPTICAM® a partir de quatro campos de grande aumento (40x) por formação. Em cada formação foram mensuradas 200 células, a partir da delimitação manual de seu núcleo, com o auxílio do cursor. Com o emprego do *software* Metamorph®, foi procedida a avaliação morfométrica considerando-se as medidas de área e perímetro nucleares. Em média os núcleos de células carcinomatosas apresentaram valores superiores quando comparados aos de células adenomatosas ($p < 0,0001$, teste T de Student, não pareado). Tais achados indicam a adequação do uso de parâmetros morfológicos na classificação de pNETs em furões e evidenciam uma analogia com a condição em humanos, na qual a cariometria também é útil na distinção entre as lesões benignas e malignas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Cariometria. Tumores neuroendócrinos pancreáticos. Furões.

INTRODUÇÃO

São considerados tumores neuroendócrinos uma ampla família de neoplasias originárias de estruturas neurais e endócrinas. A localização desses processos engloba os plexos nervosos, paragânglios, órgãos endócrinos, como tireoide, paratireoide e adrenal, além de estruturas especializadas ou elementos do referido sistema endócrino difuso, como as ilhotas pancreáticas (Rindi & Wiedenmann, 2012). As células do sistema endócrino difuso contêm duas vias reguladas de secreção caracterizadas por duas organelas de armazenamento e liberação de substâncias denominadas vesículas densas e pequenas vesículas “sinapse-like”. Considerando que os dois tipos de vesículas também são observadas em neurônios, seus constituintes e antígenos relacionados são definidos como neuroendócrinos. Neoplasias neuroendócrinas podem ser denominadas de acordo com a síndrome de hipersecreção endócrina relacionada, como no caso do insulinoma, embora sejam mais frequentes os tumores afuncionantes (Zerbi et al. 2010). Os tumores de ilhotas pancreáticas são, a partir da classificação de 2010 da Organização Mundial de Saúde, referidos como tumores neuroendócrinos pancreáticos (pNETs) (Bosman et al. 2010). Descritos pela primeira vez por Nicholls, em 1902, os pNETs, segundo o proposto pelos modelos mais recentes, apresentam duas possíveis origens: células endócrinas pancreáticas maduras (células α , β , δ e γ) e/ou células pluripotenciais do epitélio ductal (Ehehalt et al. 2009).

Dependendo da sua associação a uma síndrome funcional, devido à segregação de uma substância biologicamente ativa ou não, os tumores neuroendócrinos pancreáticos são classificados como funcionais ou não funcionais (Zhou et al. 2010).

Quando presentes em furões usualmente são hormonalmente ativos (Li & Fox, 1998). Embora os sinais associados sejam predominantemente de hipersecreção de insulina, avaliações imuno-histoquímicas revelam a produção de múltiplos hormônios, incluindo o glucagon, somatostatina, polipeptídeo pancreático e gastrina (Bailey & Page, 2007). Insulinomas são os tumores mais frequentes em furões, correspondendo a aproximadamente 25% das neoplasias diagnosticadas na espécie (Li & Fox, 1998), surgindo, na maioria dos casos, em

animais castrados de idade mais avançada, como pequenas massas esbranquiçadas firmes que medem cerca de 0,5 a 2 mm de diâmetro (Quinton, 2005; Mitchell & Tully, 2008). É caracterizado pela hipersecreção de insulina levando a uma diminuição da glicose circulante no sangue pelo carregamento para dentro das células e diminuição da gliconeogênese e glicogenólise no fígado. Embora a causa principal seja genética, tem sido sugerida a participação do excesso de carboidrato na dieta no desenvolvimento da doença (Chen, 2010). Os sinais clínicos apresentam grande variação, sendo os mais frequentes a alopecia, ginecomastia, poliúria e a polidipsia (Li & Fox, 1998).

Os tumores neuroendócrinos pancreáticos possuem uma alta taxa de mortalidade apesar dos avanços na ciência e na tecnologia. O diagnóstico é geralmente tardio, o que impossibilita uma abordagem terapêutica mais eficaz, paliativa ou curativa (Davies & Conlon, 2009). Em busca de uma alternativa para um diagnóstico precoce, uma abordagem ainda pouco explorada no âmbito dos tumores pancreáticos é o emprego de métodos morfométricos de avaliação.

A cariometria pode surgir como uma potencial alternativa para a análise das amostras histopatológicas e, em particular, de espécimes citológicos, visto prescindir das relações espaciais presentes nos tecidos. Com a recente expansão e aperfeiçoamento das técnicas de imagem aplicadas às espécies domésticas, a frequência de biópsias guiadas por ultrassom tem aumentado (Bertazzolo et al. 2014), viabilizando a amostragem citológica pancreática. Considerando-se a frequente presença de modificações na arquitetura nuclear em células neoplásicas, postula-se uma relação funcional entre organização nuclear e expressão gênica, que pode ser utilizada no diagnóstico e prognóstico de neoplasias (Zaidi et al. 2007). Assim, reconhecidamente a área nuclear e o padrão de distribuição da cromatina refletem a diferenciação e o estado funcional da célula (Bartels et al. 2009). Particularmente em lesões epiteliais malignas parâmetros nucleares podem ser úteis na detecção de lesões pré-malignas e na distinção entre condições benignas e malignas (Bartels et al. 2012). No carcinoma prostático, o tamanho e o número de nucléolos distinguem lesões benignas de processos com elevado potencial metastático (Fischer et al. 2004). Neste estudo busca-se avaliar parâmetros morfométricos nucleares em tumores pancreáticos em furões,

correlacionando-os com dados histopatológicos, investigando sua utilidade no estabelecimento do diagnóstico desses tumores.

MATERIAL E MÉTODOS

Os aspectos éticos da coleta das amostras foram realizados respeitando as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista. O projeto foi aprovado sob o protocolo 069/18.

Animais: Foram avaliadas formações nodulares provenientes de tumores neuroendócrinos pancreáticos em furões (*Mustella putorius furo*), de ambos os sexos, provenientes dos arquivos do laboratório Rous Patologia Animal.

Preservação de material para a avaliação histológica: As amostras pancreáticas provenientes de exérese cirúrgica da massa tumoral foram imediatamente imersas em solução de formol a 10%, procedendo-se após a fixação sua avaliação macroscópica e representação para emblocagem em parafina, seguindo-se à realização de cortes de aproximadamente 5 µm em micrótomo, e coloração pelo método de hematoxilina-eosina.

Classificação histopatológica: A caracterização histopatológica e a classificação das neoplasias seguiram parâmetros morfológicos descritos em literatura (Capen, 2002).

Morfometria: Os cortes teciduais foram analisados em microscópio óptico, obtendo-se imagens digitalizadas, capturadas pelo fotomicroscópio OPTICAM®, a partir de 4 campos de grande aumento (40x) por formação. Em cada um dos campos foram mensuradas 50 células neoplásicas, a partir da delimitação manual de seu núcleo, com o auxílio do cursor. Com o emprego do software Metamorph®, foi procedida a avaliação morfométrica considerando-se as medidas de área e perímetro nucleares, expressas em pixels.

Avaliação estatística: A comparação entre os parâmetros morfométricos e a classificação histopatológica foi feita com o teste t de Student, sendo o nível de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significante.

RESULTADOS

Os casos avaliados foram provenientes de clínica veterinária particular, e diagnosticados no laboratório Rous Patologia Animal, sendo submetidos à avaliação macroscópica, amostragem e processamento histológico de rotina. No total foram analisados nove produtos de ressecção cirúrgica de neofomações pancreáticas de furões, todos gonadectomizados, havendo o predomínio de machos (5). Nestes os processos malignos foram mais frequentes (4), frente a apenas 1 lesão benigna. Já nas fêmeas detectou-se uma incidência semelhante de lesões benignas (2) e malignas (2). Embora a faixa etária de acometimento tenha variado entre 3 e 6 anos de idade, a maior parte das formações foi identificada em animais entre os 4 e 5 anos de idade. A partir de critérios morfológicos o diagnóstico histopatológico revelou o predomínio de carcinomas (6) frente aos adenomas (3) (Quadro 1).

Quadro 1. Casos de tumor neuroendócrino pancreático nos furões, correlacionando-se gênero, idade e diagnóstico.

caso	gênero	Idade (anos)	diagnóstico
1	macho	4	maligno
2	fêmea	5	benigno
3	macho	4	maligno
4	fêmea	3	maligno
5	fêmea	6	maligno
6	macho	6	maligno
7	macho	4	benigno
8	fêmea	5	benigno
9	macho	5	maligno

Macroscopicamente as formações eram sólidas, macias, homogêneas, variando de coloração, entre o castanho claro e o esbranquiçado, indistintamente, em adenomas e carcinomas.

A avaliação histopatológica revelou a expansão de população de ilhotas pancreáticas, constituindo agregados sólidos delimitados, em ninhos, por delicado estroma reticular e moderada vascularização, com o predomínio de capilares retilíneos. As células neoplásicas exibiram discreta anisocitose, sendo predominantemente ovaladas ou poliédricas e anisocariose leve, com ocasional hiperchromasia nuclear. Também foi percebido citoplasma amplo fracamente acidofílico (figura 1). Desmoplasia importante com áreas de hialinização eventual empilhamento (figura 2). Figuras de mitose foram infrequentes. Infiltrado leucocitário eventual, linfoplasmocítico (figura 3). Em formações benignas foi possível a caracterização de cápsula fibrosa, em geral espessa, delimitando a formação (figura 3). Nas formações malignas merece destaque a invasão de parênquima exócrino (figura 4).

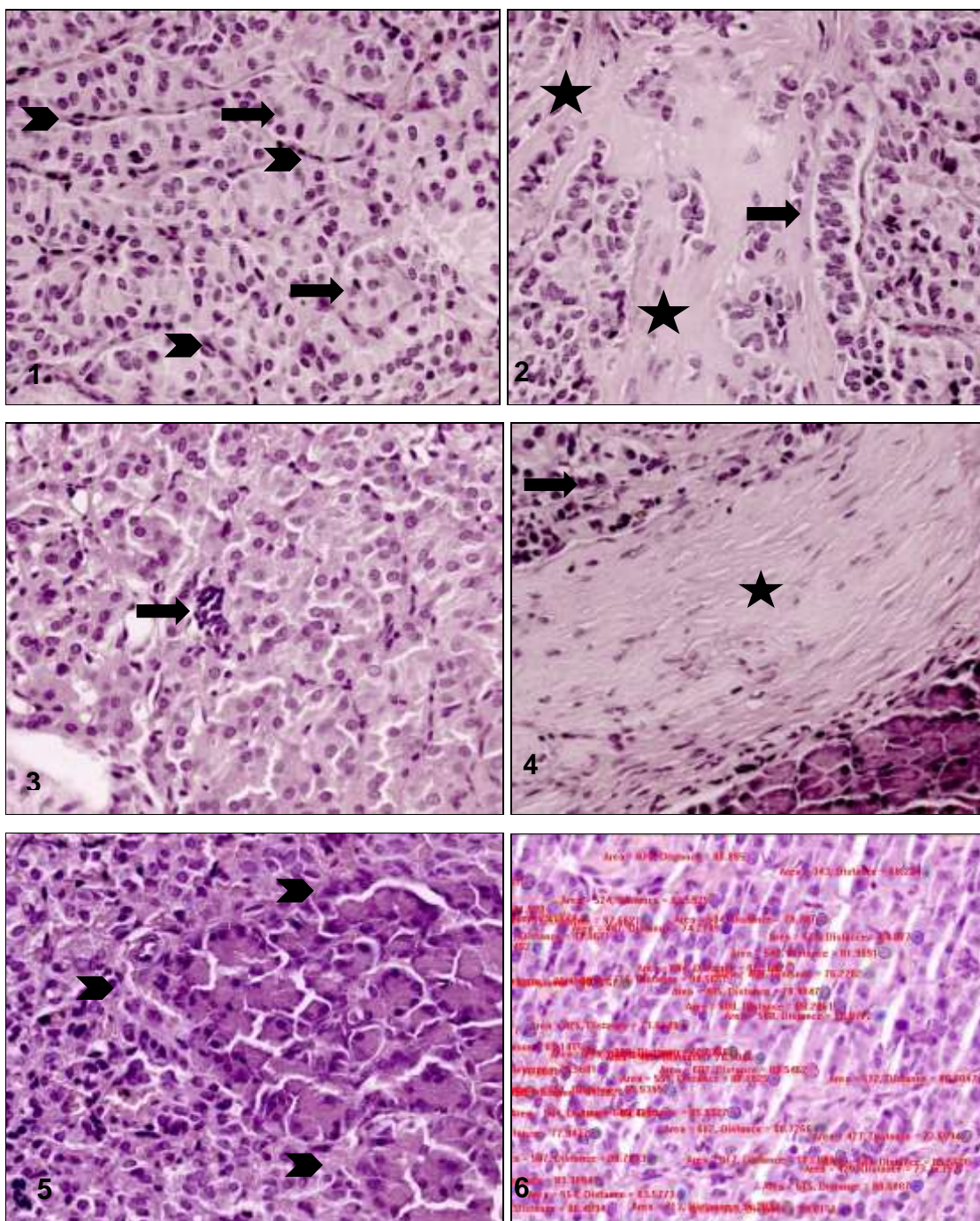


Figura 1: Fotomicrografia de corte histológico de adenoma pancreático, exibindo ninhos de células de ilhotas, poliédricas, homogêneas. Discreta anisocariose. Amplo citoplasma fracamente acidofílico. Estroma reticular escasso. Delgada rede capilar (pontas de seta). Hematoxilina-eosina, 40x. (Fonte: arquivo pessoal, 2018).

Figura 2: Fotomicrografia de corte histológico de adenoma pancreático, exibindo desmoplasia associada a hialinização estromal (estrelas), e área de empilhamento celular (seta). Hematoxilina-eosina, 40x. (Fonte: arquivo pessoal, 2018).

Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma pancreático, exibindo infiltrado linfoplasmocítico focal (seta). Hematoxilina-eosina, 40x. (Fonte: arquivo pessoal, 2018).

Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de adenoma pancreático, exibindo espessa estrutura capsular (estrela), delimitando massa tumoral (seta). Em contraste a pâncreas exócrino preservado em canto inferior direito. Hematoxilina-eosina, 40x. (Fonte: arquivo pessoal, 2018).

Figura 5: Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma pancreático, invadindo parênquima de pâncreas exócrino (pontas de seta). Hematoxilina-eosina, 40x. (Fonte: arquivo pessoal, 2018).

Figura 6: Fotomicrografia de formação pancreática submetida a avaliação cariométrica, evidenciando o delineamento das estruturas nucleares mediante o uso do cursor e mensuração com software Metamorph®.(Fonte: arquivo pessoal, 2018).

A classificação histopatológica foi utilizada como parâmetro para a composição dos grupos de adenomas e carcinomas visando a avaliação morfométrica. A figura 6 exemplifica o resultado da mensuração de um campo histopatológico avaliado com a delimitação individual de cada núcleo neoplásico avaliado.

A partir desses dados foram obtidos os valores médios para cada parâmetro, comparando-se processos histologicamente benignos e malignos. Nas lesões benignas, o valor médio encontrado para a área nuclear foi de $508,95 \pm 6$ pixels enquanto nas malignas $546,9 \pm 4$ pixels (figura 8). Para o perímetro nuclear, os valores médios foram, respectivamente, de $81,09 \pm 0,5$ e $83,63 \pm 0,3$ pixels (figura 9). Para ambos os parâmetros, área e perímetro nucleares, foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com $p < 0,0001$,

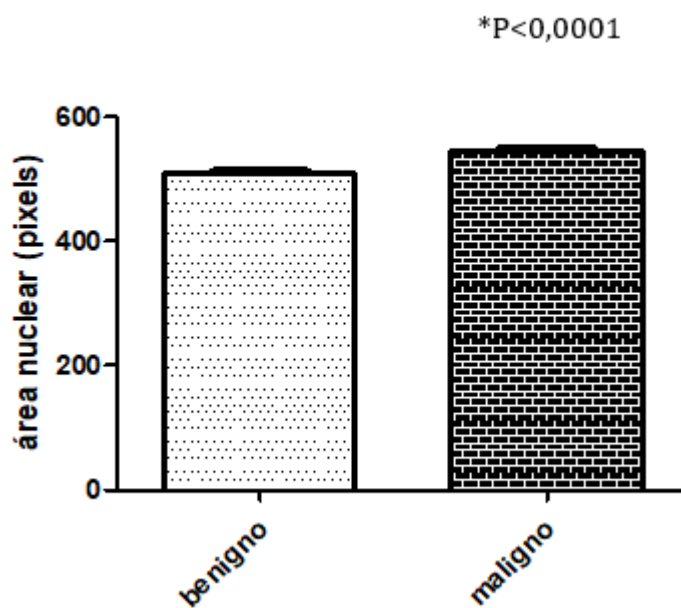


Figura 8: Nas lesões benignas, o valor médio encontrado para a área nuclear foi de $508,95 \pm 6$ pixels enquanto nas malignas $546,9 \pm 4$ pixels (* $p < 0,0001$, teste t de Student não pareado).

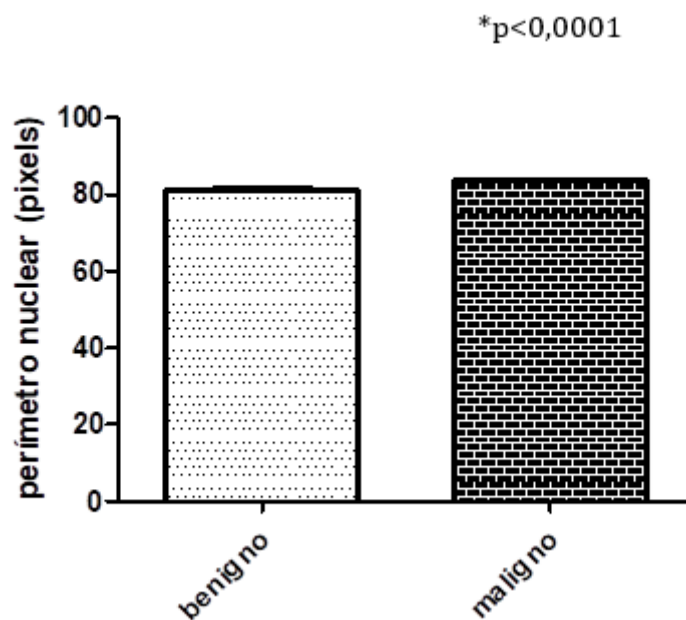


Figura 9: Para o perímetro nuclear, os valores médios foram, respectivamente, de $81,09 \pm 0,5$ e $83,63 \pm 0,3$ pixels (* $p < 0,0001$, teste t de Student não pareado).

DISCUSSÃO

Tumores neuroendócrinos são definidos como lesões neoplásicas, benignas ou malignas, constituídas por células com um fenótipo neuroendócrino bem definido ou por células pouco diferenciadas mas ainda com características neuroendócrinas proeminentes (Solcia et al. 1990). Os pNETs são raros na espécie humana, correspondendo a cerca de mil casos novos a cada ano nos Estados Unidos, porém com viés de crescimento (Fraenkel et al. 2012). Embora o conhecimento acerca desse grupo de condições venha crescendo nos últimos anos, fundamentado particularmente em avanços na tecnologia investigativa, a morbidade e mortalidade ainda são significantes e a busca por modelos de estudo animais se mantem, sendo em sua maioria murinos (Yu, 2016). Alguns fatores motivaram o emprego do furão para esse estudo. Nas últimas décadas, a espécie começou a ser adotada como animal de estimação, e, como animais exóticos, passaram a ser importados exclusivamente gonadectomizados. Uma das consequências desse procedimento nos furões é um incremento na frequência de neoplasias, dentre as quais os tumores de ilhotas pancreáticas, adrenocorticais e linfocitários, o que os torna um potencial candidato a modelo de estudo em patologia comparada (Iwa et al. 2008). Em paralelo, conseqüente a sua condição de animal de companhia, cresceu a demanda por métodos adequados de diagnóstico e tratamento das diferentes condições mórbidas prevalentes na espécie, entre elas os pNETS. Nesse sentido, este estudo buscou avaliar as características cariométricas em pNETs de furões, avaliando seu potencial na distinção entre processos benignos e malignos.

Em consonância com o descrito na literatura, a maioria dos animais neste estudo foi diagnosticada com pNETs entre 4 e 5 anos de idade, embora tenham sido identificados extremos de animais com 3 e 6 anos de idade (Antinoff, 2012). Merece referência a ampla desproporção entre lesões benignas e malignas em machos, com predomínio das últimas. Caplan et al. (1996) referem uma incidência crescente de pNETs em machos.

Como parâmetro central neste estudo foi empregada a classificação histopatológica dos pNETs. No entanto, existe controvérsia na literatura, acerca da adequação da avaliação histopatológica na distinção entre lesões benignas e

malignas de pâncreas endócrino, visto que a classificação morfológica dessas formações, em adenomas e carcinomas, tanto em humanos quanto em furões, nem sempre implica em diferenças em seu comportamento biológico (Halldanarson et al. 2008). Classicamente a distinção entre essas condições relaciona-se a delimitação do processo por cápsula fibrosa, sendo que os critérios de anaplasia em geral envolvem maior subjetividade (Capen, 2002). Em razão da perda de vínculo entre aspectos morfológicos e comportamento biológico da condição, para as lesões humanas, novos parâmetros classificatórios têm sido empregados, com destaque para a avaliação proliferativa com o uso da imunomarcagem pelo Ki-67, permitindo a separação dos pNETs em tumores neuroendócrinos pancreáticos bem diferenciados (panNETs) e carcinomas neuroendócrinos pancreáticos pouco diferenciados (panNECs) (Kloppel et al. 2017).

Considerando estudos pretéritos de condições com relativa inespecificidade de achados histopatológicos, a análise morfométrica forneceu informações precisas e relevantes para a distinção entre os processos patológicos, como em cistoadenocarcinomas mucinosos ovarianos limítrofes Baak et al. (1981), na distinção entre regeneração e displasia epitelial colônica Allen et al. (1988) ou na separação entre displasias e carcinomas gástricos Jarvis & Whitehead, (1975). Particularmente a avaliação cariométrica é relevante na diferenciação entre natureza e graus de lesões neoplásicas, como o caracterizado, em humanos, em urotélio reacional e carcinomatoso (Poropatich et al. 2016), ou em lesões hiperplásicas, adenomatosas e carcinomatosas adrenocorticais (Diaz-Cano et al. 1993), ou em carcinomas espinocelulares (Bartels et al. 2012). Em cães foi evidenciado diferenças cariométricas consistentes acompanhando a agressividade neoplásica em mastocitomas cutâneos (Strefezzi et al. 2003).

A análise das imagens nucleares consistiu na transformação da imagem obtida na microscopia óptica em informação numérica que foi analisada por um sistema de computador que passou pelo processo de captura e transcrição da imagem para o formato digital, processamento da imagem, segmentação, extração das características morfo e fotométricos, análise e classificação. A mensuração das imagens digitalizadas dos núcleos deu origem a diferentes dados que não seriam detectados sem a aplicação da análise de imagem digital. A interpretação permitiu a criação de uma assinatura digital específica para cada núcleo (Longatto et al.

2000). Nesse contexto, a morfometria eleva a reprodutibilidade da avaliação e reduz o erro pertinente à interpretação (Prvulovic et al. 2010)

Embora mediante a avaliação morfológica das células neoplásicas em cortes corados pela hematoxilina-eosina não tenham sido identificadas diferenças expressivas entre as populações neoplásicas, a mensuração nuclear revelou uma elevada homogeneidade nas células benignas e malignas, gerando um desvio padrão reduzido nas formações de natureza distinta, determinando uma diferença estatisticamente significativa entre lesões benignas e malignas em furões, seguindo a relação conhecida entre núcleos menores/menor agressividade, e núcleos maiores/menor agressividade. Esses achados reforçam a relação biológica entre arquitetura nuclear e função celular. Mais que isso, a grande proximidade nos parâmetros cariométricos detectados entre as condições benignas e malignas sugerem uma similaridade biológica entre as condições e a presença de uma estreita divergência molecular entre elas, talvez representada por mutações em um restrito grupo de genes, à semelhança do identificado em humanos (Alexakis & Neoptolemos, 2008). Nestes, têm sido caracterizadas mutações em grupos gênicos particulares, distintos daqueles comprometidos nos carcinomas de pâncreas exócrino, como em MEN1, que codifica para a menina, envolvida no controle da remodelação da cromatina e DAXX e ATRX, relacionados ao controle da cromatina telomérica (Jiao et al. 2011).

Nossos achados, à semelhança do relatado por Kenny et al. (1989), em pNETs na espécie humana, sinalizam para a validade do emprego da cariometria na interpretação das amostras tumorais de pâncreas endócrino, em potencial tanto em amostras histopatológicas quanto citológicas (Bertazzolo et al. 2014). A convergência com achados descritos em lesões análogas em humanos reforça a utilidade do emprego dos pNETs em furões como modelos em patologia comparada.

CONCLUSÃO

Os achados descritos reforçam a relação biológica entre arquitetura nuclear e função celular, indicando a viabilidade do emprego da cariometria no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas em tumores neuroendócrinos pancreáticos de furões.

REFERÊNCIAS

- Alexakis N & Neoptolemos J.P. 2008. Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best Practice Research Clinival Gastroenterology*; 22-1:183-205.
- Allen D.C., Hamilton P.W., Watt P.C.H., Biggart J.D. 1988. Architectura morphometry in ulcerative colitis with dysplasia. *Histopathology*; 12: 611-622.
- Antinoff N & Willams B.H. 2012. Neoplasia. In K.E, Ferrets, rabbits and rodents: Clinical medicine and surgery, 3th edition. St.Louis, Missouri: Saunders. 103-121.
- Baak J.P.A., Agrafojo Blaco A., Kurver P.H.J. 1981. Quantitation of borderline and malignant mucinous ovarian tumours. *Histopathology*; 5: 353-360.
- Bailey D.B & Page R.L. 2007. Tumors of the endocrine system. In Withrow e MacEwen`s Small Animal Clinical Oncology, 4th edition. S.J Withrow and D.M Vail, editors. St. Louis: Saunders. 583-609.
- Bartels, P. H., Bartels, H. G., Alberts, D. S., Yozwiak, M., Rama Rao, A. P., Glazer, E. S., & Krouse, R. S. 2012. Karyometry of nuclear phenotypes in cutaneous squamous cell cancer. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 34: 1-8.
- Bartels P.H., Montironi. R., Scarpelli. M., Bartels H.G., David S. Alberts D.S. 2009. Knowledge discovery processing and data mining in karyometry. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*; 31: 125-136.
- Bertazzolo W., Didier M., Gelain M.E., Rossi S., Crippa L., Avallone G., Roccabianca P., Bonfanti U., Giori L., Fracassi F. 2014. Accuracy of cytology in distinguishing adrenocortical tumors from pheochromocytoma in companion animals. *Veterinary Clinical Pathology*; 43: 453-459.
- Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. 2010. WHO classification of tumours of the digestive system, 4th edition. 3, IARC Press, Lyon.
- Capen C.C. 2002. Tumors of the endocrine glands. In: MEUTEN DJ. Tumors in domestic animals, 4th edition. Iowa State Press.
- Caplan E.R., Peterson M.E., Mullen H.S., Quesenberry K.E., Rosenthal K.L., Hoefler H.L., Moroff S.D. Diagnosis and treatment of insulin secreting pancreatic islet cell tumors in ferrets: 57 cases (1986-1994). *J Am Vet Med Assoc*. 1996; 209:1741-1745.
- Chen S. 2010. Advanced diagnostic approaches and medical management of insulinomas and adrenocortical disease in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Veterinary Clinics of North America: Exotic animal Practice*. 13: 439-452.
- Davies K & Conlon K.C. 2009. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Current Gastroenterology Reports*; 11-2:119-27.

- Díaz-Cano S., Gonzalez C.R., Juan J., Martin R., Enrique Lerma P.E., Jorda M., Ramirez F.V., Bibbo M., 2, Hugo Galera-Davidson H.G. 1993. Nuclear DNA patterns in adrenal cortex proliferative lesions Human Pathology. 32: 1232-1239.
- Ehehalt F., Hans D. Saeger H.D., Schmidt C.M., Grützmann R. 2009. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Oncologist*. 14:456-467.
- Fischer A.H., Bardarov S Jr., Jiang Z. 2004. Molecular aspects of diagnostic nucleolar and nuclear envelope changes in prostate cancer. *Journal of Cell Biochemistry*. 91:170-184.
- Fraenkel M., Kim M.K., Faggiano A., Valk G.D. 2012. Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. 26: 691-703.
- Halfdanarson T.R., Rubin J., Farnell M.B., Grant C.S, Petersen G.M. 2008. Pancreatic endocrine neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors. *Endocrine Related Cancer*; 15-2:409-27.
- Iwa y., Nakata M., Kurosawa A., Sasai H., Sasaki N. 2008. Adrenal diseases in ferrets in Japan. *Journal Veterinary Medicine Science*. 70: 1323-1326.
- Jarvis L.R & Whitehead R. 1975. Morphometric analysis of gastric dysplasia. *J. Pathology*. 147: 133-138.
- Jiao Y., Shi C., Edil B.H., Wilde R.F., Klimstra D.S., Maitra A., Schlick R.D., Tang L.H., Wolfgang C.L., Choti M.A., Velculescu V.E., Diaz L.A Jr., Vogelstein B., Kinzler K.W., Hruban R.H., Papadopoulos N. 2011. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 331:1199-203.
- Kloppel, G., Lloyd R.V., Osamura R.Y., Rosai J. 2017. Tumours of the endocrine pancreas. In: LLOYD, R. V. et. (Eds). *WHO Classification of the Tumours of Endocrine Organs*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 175-207.
- Li X & Fox J.G. 1998. Neoplastic diseases. In: FOX, J.G, *Biology and Diseases of the Ferret*, 2nd ed., Blackwell Publishing, London. 405-448.
- Longatto F.A., Santinelli A., Montironi R. 2000. Chromatin texture by computer – assisted image analysis. *Pathologica*. 92: 94 – 5
- Mitchell M & Tully T. 2008. *Manual of Exotic Pet Practice*. Philadelphia: Elsevier. 560.
- Poropatich K., Yang J.C., Goyal R., Parini V., Yang X.J. 2016. Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. *Diagnostic Pathology*. 11: 5757-61.

- Prvulović I, Kardum S.I., Sustercić D., Razumović J.J., Manojlović S. 2010. Morphometry of tumor cells in different grades and types of breast cancer. *Collegium Antropologicum*. 34, 99-103.
- Quinton, J. F. 2005. *Novos animais de estimação: pequenos mamíferos*. Paris: Roca, p.332 – 333.
- Rindi G & Wiedennmann B. 2012. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nature*. 8: 54-64.
- Solcia E, Rindi G, Capella C. 1990. In: *Histochemistry in Pathology 2 ed.* (eds Felipe MUI & Lake BD. 397-409 (Churchill-Livingstone, Edinburgh).
- Strefezzi R.F., Xavier JG., Catão-Dias J.L. 2003. Cytologic nuclear morphometry of canine cutaneous mast cell tumors: relationship with histopathological grading. *Veterinary Pathology*. 40: 268-275.
- Zaidi S.K., Young D.W., Javed A., Pratap J., Martin Montecino M., Wijnen A.JV., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S.2007. Nuclear microenvironments in biological control and cancer, *Nature Reviews*. 7: 454-463.
- Zerbi A, Falconi M., Rindi G., Delle F.G., Tomassetti P., Pasquali C., Capitanio V., Boninsegna L., Di C.V. 2010. Clinicopathological features of pancreatic endocrine tumors: a prospective multicenter study in Italy of 297 sporadic cases. *American Journal of Gastroenterology*. 105: 1421-1429.
- Zhou C., Zhang J., Zheng Y., Zhu Z. 2010. Pancreatic neuroendocrine tumors: a comprehensive review. *International Journal of Cancer*. 131: 1013-22.
- Yu R. 2016. Animal models of spontaneous pancreatic neuroendocrine tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 421: 60-67.