

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**USO DA CARIOMETRIA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
ENTRE LESÕES ADRENOCORTICAIS BENIGNAS E
MALIGNAS EM CÃES E 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

MARIO JOSE DOS SANTOS JUNIOR

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

**USO DA CARIOMETRIA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
ENTRE LESÕES ADRENOCORTICAIS BENIGNAS E
MALIGNAS EM CÃES E 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.

MARIO JOSE DOS SANTOS JUNIOR

São Paulo
2017

Santos Junior, Mario Jose dos.

Uso da cariometria no diagnóstico diferencial entre lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães e furões (*Mustela putorius furo*) / Mario Jose dos Santos Junior. - 2017.

28 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, 2017.

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

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Cariometria.
 2. Tumor de adrenal.
 3. Histopatologia.
 4. Cães.
 5. Furões.
- I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

MARIO JOSE DOS SANTOS JUNIOR

**USO DA CARIOMETRIA NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
ENTRE LESÕES ADRENOCORTICAIAS BENIGNAS E
MALIGNAS EM CÃES E 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. Dr. Milton Kolber
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima
Universidade de São Paulo – USP

DEDICATÓRIA

Ao meu querido Prof. Guilherme pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, principalmente por sua paciência sem fim para realização deste trabalho.

RESUMO

O diagnóstico diferencial de formações nodulares adrenocorticais representa um desafio ao patologista, dada a sobreposição de características morfológicas entre condições benignas e malignas. O objetivo deste estudo foi avaliar a adequação da morfometria nuclear na distinção entre esses processos em cães e furões (*Mustela putorius furo*). Para tanto, foram reunidas 20 lesões nodulares adrenocorticais, provenientes de adrenalectomias em furões e cães. Todas as amostras utilizadas neste estudo foram fixadas em formalina e submetidas a processamento histológico de rotina. Para cada amostra, foram realizados cortes de 5 µm de espessura para exame histológico. Histopatologicamente, foram diagnosticados em cães, 4 hiperplasias, 2 adenomas e 4 carcinomas. Nos furões 3 hiperplasias, 2 adenomas e 5 carcinomas. A partir de imagens obtidas com o microscópio Opticam® acoplado à câmara, procedeu-se a morfometria nuclear com o emprego do software Metamorph®, delineando-se manualmente, com o cursor, os núcleos das células parenquimatosas nas lesões adrenocorticais, avaliando-se área e perímetro nucleares. O diagnóstico histopatológico foi realizado a partir de critérios previamente descritos em literatura para as lesões adrenocorticais em humanos, destacando-se o pleomorfismo celular, atividade mitótica, invasão capsular e embolização vascular nas condições malignas. Foi identificada diferença estatisticamente significante, em área e perímetro nucleares, entre lesões benignas e malignas, em ambas as espécies ($p<0,0001$, teste t de Student). Tais achados reforçam a relação entre arquitetura nuclear e função celular e sinalizam para a possibilidade do uso da citologia no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas adrenocorticais.

Palavras-chave: Cariometria. Tumor de adrenal. Histopatologia. Cão. Furão.

ABSTRACT

The differential diagnosis of adrenocortical nodular formations represents a challenge to the pathologist, given to overlapping of morphological characteristics between benign and malignant conditions. The aim of this study was to evaluate the adequacy of nuclear morphometry in the distinction between them, in dogs and ferrets (*Mustela putorius furo*). Therefore, 20 adrenocortical nodular lesions were collected, from adrenalectomies in ferrets and dogs. All tissues used in this study were fixed in formalin and routinely processed for histology. From each specimen, a 5µm hematoxylin and eosin-stained sections were made for histologic examination. Histopathologically, 4 hyperplasias, 2 adenomas and 4 carcinomas were diagnosed in dogs. In ferrets, 3 hyperplasias, 2 adenomas and 5 carcinomas. From the obtained images with the Opticam® microscope coupled to the camera, a nuclear morphometry was made using Metamorph® software, outlining manually, with the cursor, the nucleus of parenchymal cells in the adrenocortical lesions, evaluating nuclear area and perimeter. The histopathological diagnosis was made based on previous described criteria for the adrenocortical lesions in humans, highlighting the cellular pleomorphism, mitotic activity, capsular invasion and vascular embolization in malignant conditions. A statistically significant difference was found in nuclear area and perimeter between benign and malignant lesions in both species ($p <0.0001$, Student's t test). These findings reinforce the relationship between nuclear architecture and cellular function and signalise the possibility of using cytology in the differential diagnosis between benign and malignant adrenocortical lesions.

Key-words: Kariometry. Adrenal tumor. Histopathology. Dogs. Ferrets.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
MATERIAIS E MÉTODOS	9
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	25

INTRODUÇÃO

Tumores em adrenais são infrequentes em cães, compreendendo entre 0,17 a 0,76% das condições oncológicas na espécie. Em particular aqueles derivados do córtex adrenal correspondem a 10 a 20% dos casos de síndrome de Cushing na espécie (Labelle et al, 2004). Já em furões exibem elevada frequência, sendo superados em ocorrência apenas pelas neoplasias de pâncreas endócrino, associando-se a sinais clínicos como alopecia, ginecomastia, poliúria e polidipsia (Li & Fox, 1998). O incremento na ocorrência de neoplasias adrenocorticais nessa espécie está relacionada à castração precoce, com 2 a 4 meses de idade (Shoemaker et al., 2000).

Considerando-se a similaridade morfológica entre as lesões nodulares adrenocorticais em humanos, cães e furões, sugeriu-se a abordagem dessas lesões em animais como modelos para a condição em humanos, dentro do contexto de patologia comparada (Galac & Wilson, 2015). Segundo a literatura, independentemente da espécie, predominam os processos benignos, envolvendo hiperplasias e adenomas (Weiss & Scott, 1997). Um dos maiores desafios relacionados a estas lesões é de caráter diagnóstico, visto que as características morfológicas das nodulações, sejam hiperplásicas, neoplásicas benignas ou malignas frequentemente se sobrepõem, tornando amiúde subjetiva a distinção entre estas condições.

Os principais parâmetros morfológicos utilizados para o diagnóstico diferencial das lesões adrenocorticais foram descritos por Weiss, 1984, compreendendo padrão de crescimento, presença de cápsula, grau de vascularização, pleomorfismo celular, atividade mitótica, invasão capsular e embolização tumoral. Parâmetros adicionais, no sentido de distinguir entre processos hiperplásicos, neoplásicos benignos e malignos têm sido avaliados, particularmente nas espécies humana e canina, destacando-se a pesquisa de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da atividade proliferativa propriamente dita (Libé, 2015).

Em humanos e cães foi caracterizada uma relação direta entre a atividade mitótica no tecido neoplásico e a evolução clínica do paciente (Miller et al., 2010; Labelle et al, 2004; Weiss, 1984). Nosso grupo identificou, em formações adrenocorticais de furões, diferença estatisticamente significante entre a atividade proliferativa em lesões benignas e malignas, mensurada a partir da marcação de

moléculas relacionadas à proliferação, como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno Ki-67 (Xavier & Mourão, 2011). No entanto, o emprego desses procedimentos apresenta limitações, como o maior custo e a disponibilidade de reagentes e anticorpos para a imunomarcação.

Uma alternativa ainda pouco explorada no âmbito dos tumores adrenocorticais de animais é o emprego de métodos morfométricos de avaliação. Em particular a cariometria pode surgir como uma potencial alternativa para a análise de amostras citológicas dessas lesões, nas quais o referencial arquitetural é perdido. Com a recente expansão e aperfeiçoamento das técnicas de imagem aplicadas às espécies domésticas, a frequência de biópsias guiadas por ultrassom tem aumentado, envolvendo inclusive a maior representação citológica de formações adrenocorticais (Pagani et al., 2016). Bertazzolo et al., 2014, relatam a dificuldade na distinção, a partir da citopatologia convencional, entre lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães.

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).

Em cães, nosso grupo evidenciou diferenças cariométricas consistentes acompanhando a agressividade neoplásica em mastocitomas cutâneos (Strefezzi et al., 2003). Em formações adrenocorticais humanas foi caracterizada a diferença entre parâmetros morfométricos nucleares, considerando-se lesões hiperplásicas, adenomas e carcinomas (Diaz-Cano et al., 1993). Neste estudo buscou-se avaliar parâmetros morfométricos nucleares em formações adrenocorticais de cães e furões, correlacionando-os com dados histopatológicos, investigando sua utilidade no estabelecimento do diagnóstico dessas lesões e seu potencial como modelo biológico para o estudo de tumorações adrenocorticais na espécie humana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de ética: projeto submetido e aprovado pelo CEUA, com o protocolo 099/16.

Animais: foram avaliadas 20 formações nodulares provenientes de adrenalectomias de cães e furões (*Mustella putorius furo*), de ambos os sexos, provenientes dos arquivos do setor de Patologia da Universidade Paulista, e do laboratório Rous Patologia Animal.

Colheita de material para a avaliação histológica: as amostras analisadas foram provenientes de adrenalectomias, fixadas em solução de formol a 10%, avaliadas macroscopicamente, representadas e submetidas à processamento histológico com emblocagem em parafina, seguindo-se a realização de cortes de aproximadamente 5 µm em micrótomo, corados pelo método de hematoxilina-eosina.

Classificação histopatológica: os cortes de adrenal corados pela hematoxilina-eosina foram examinados ao microscópio óptico, sendo o diagnóstico do processo baseado em critérios estabelecidos em literatura, com destaque para a presença de cápsula, grau de vascularização, pleomorfismo celular, atividade mitótica, invasão capsular e embolização tumoral. (Labelle et al, 2004; Stojadinovic et al., 2003; Li & Fox, 1998; Weiss, 1984).

Morfometria: os cortes teciduais foram analisados em microscópio óptico, obtendo-se imagens digitalizadas, capturadas pelo sistema NIKON E 200 - Coolpix®, com resolução de 102070 dpi. Foram submetidas a avaliação morfométrica com o emprego do software Metamorph®, avaliando-se formações adrenocorticais, quantificando-se os parâmetros nucleares área e perímetro, a partir da contagem de 200 células por amostra (Strefezzi et al, 2003). Para tanto, com o auxílio do cursor, foram delineados individualmente os núcleos celulares das formações adrenocorticais.

Avaliação estatística: a comparação entre os índices entre processos benignos e malignos foi realizada com o emprego do teste t de Student, com o emprego do

software GraphPrism 7®. O nível de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significante.

RESULTADOS

Os casos avaliados foram provenientes de Clínica veterinária particular e dos setores de Patologia do HOVET da Universidade Paulista e laboratório Rous Patologia Animal, sendo submetidos à avaliação macroscópica, amostragem e processamento histológico de rotina. Em cães destacou-se a ocorrência de amostras provenientes de shih-tzus e lhasas (2 de cada), sendo 4 lesões originárias de animais sem raça definida (SRD). Completou a amostragem um carcinoma em poodle com lesão metastática em fígado, sendo realizada a morfometria das lesões em separado. No total foram 7 fêmeas e 2 machos, com a faixa etária variando entre 5 e 10 anos (quadro 1).

Quadro 1. Casos de lesões adrenocorticais de cães, relacionando-se a raça, gênero, idade e diagnóstico.

Animal	raça	gênero	idade	diagnóstico
1	lhasa apso	F	9	adenoma
2	shih-tzu	F	9	adenoma
3	shih-tzu	F	8	adenoma
4	lhasa apso	F	5	hiperplasia
5	poodle	F	12	carcinoma
6	poodle	F	12	carcinoma
7	SRD	F	8	adenoma
8	SRD	M	10	carcinoma
9	SRD	F		carcinoma
10	SRD	M		adenoma

Dentre os furões, todos gonadectomizados, predominaram amostras provenientes de machos, compreendendo 70% das lesões, envolvendo animais entre 3 e 6 anos de idade (quadro 2).

Quadro 2. Casos de lesões nodulares adrenocorticiais em furões, considerando gênero, idade e diagnóstico.

Animal	gênero	Idade	diagnóstico
01	M	5	hiperplasia
02	F	4	adenoma
03	F	3	hiperplasia
04	M	6	hiperplasia
05	M	4	carcinoma
06	M	5	carcinoma
07	M	6	carcinoma
08	M	6	carcinoma
09	M	5	carcinoma
10	F	5	adenoma

De maneira geral as lesões caracterizaram-se pela presença de sobrelevação superficial, associada à massa sólida, eventualmente circunscrita, em território cortical adrenal, de coloração castanho-amarelada (figura 1). Eventualmente discretas áreas císticas surgiam em meio à nodulação.

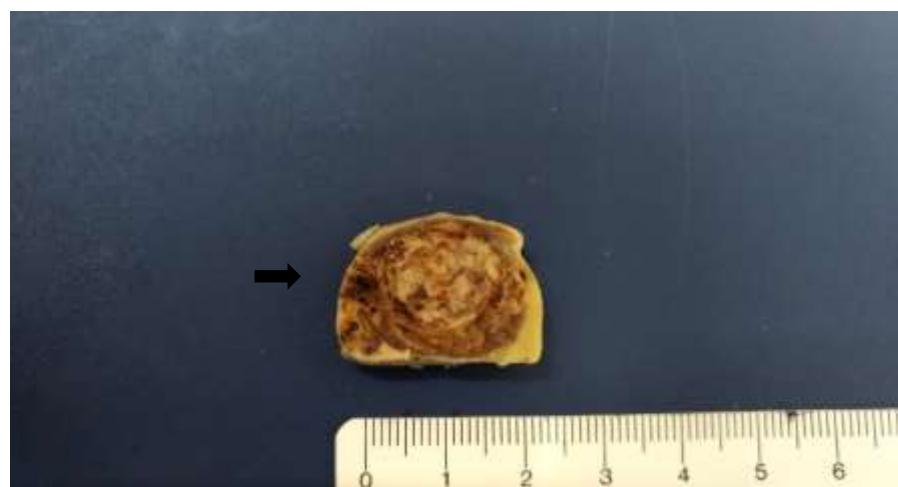


Figura 1. Amostra de lesão nodular adrenocortical em cão, diagnosticada como adenoma (seta)

No total foram analisadas 20 formações adrenocorticiais, 19 em adrenais e uma metástase hepática. Em cães foram reunidas 10 formações, provenientes de 9 animais, representadas por 1 hiperplasia, 5 adenomas e 4 carcinomas (figuras 4 e 5). Em relação aos furões foram avaliadas 10 lesões, sendo 5 benignas, representadas por 3 hiperplasias e 2 adenomas, e 5 malignas, todas carcinomas (figuras 2 e 3).

Em termos microscópicos evidenciou-se grande similaridade entre as espécies em relação à arquitetura lesional. As lesões nodulares foram constituídas por tecido sólido, composto por células poliédricas, dispostas preferencialmente em agregados de aspecto lobular, exibindo núcleo central, ovalado e amplo citoplasma microvacuolizado, fracamente acidofílico, compatíveis com células parenquimatosas de zonas fasciculada e reticulada. O estroma tumoral foi escasso, sendo constituído principalmente por fibras reticulares (figura 2).

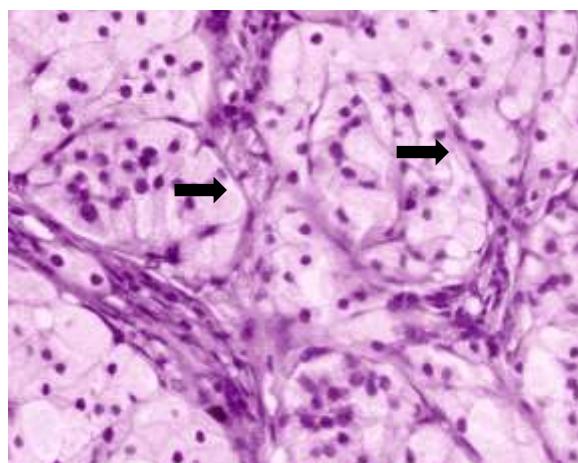


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de formação adrenocortical benigna de furão (*Mustela putorius furo*), evidenciando expansão em agregados coesos, apresentando núcleo ovalado e citoplasma microvacuolizado, delimitados por delicado estroma, composto por fibras reticulares (setas) (hematoxilina-eosina, 40x).

Particularmente em adenomas foi possível a caracterização de delimitação tumoral por espessa cápsula conjuntiva (figura 3).

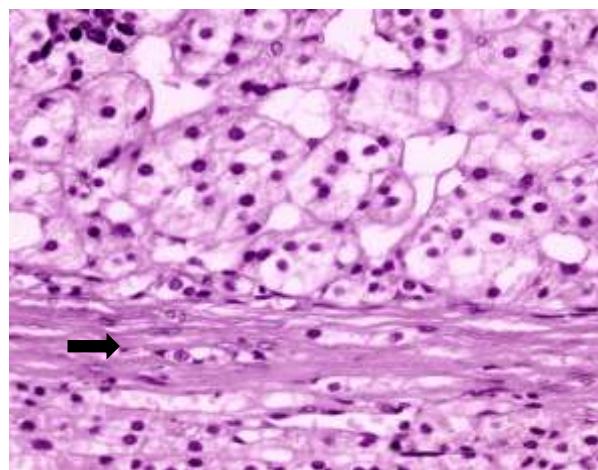


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de formação em adrenal de furão (*Mustela putorius furo*) exibindo estrutura capsular (seta) (hematoxilina-eosina, 40x).

Figuras de mitose foram incomuns nas lesões hiperplásicas e adenomatosas, havendo incremento nos processos malignos, nos quais também foram identificadas figuras mitóticas atípicas (figura 4). Nestes merece referência a observação de focos de invasão vascular, com a identificação de êmbolos neoplásicos (figura 5), e ausência de delimitação do processo.

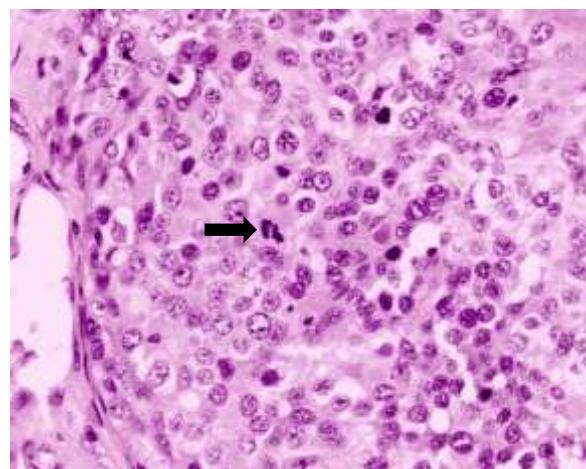


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de formação adrenocortical de cão compatível com carcinoma, apresentando anisocariose e incremento mitótico com atipias (seta). (hematoxilina-eosina, 40x).

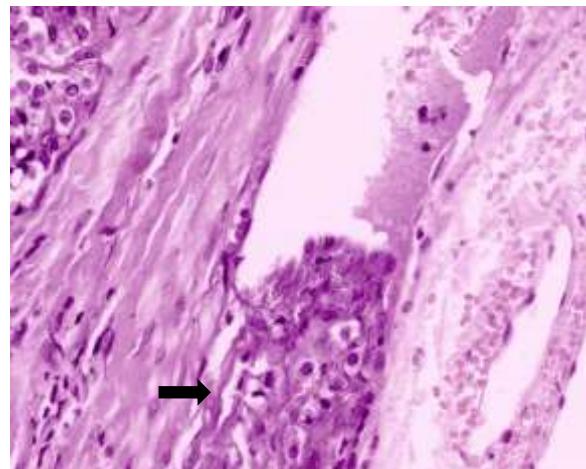


Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma adrenocortical de cão embolizando vaso sanguíneo (seta) (hematoxilina-eosina, 40x).

Para a realização da cariometria as lesões hiperplásicas e adenomatosas foram agrupadas como benignas e os carcinomas compuseram o grupo dos processos malignos, sendo mensurados para cada célula, área e perímetro nucleares (figura 6).

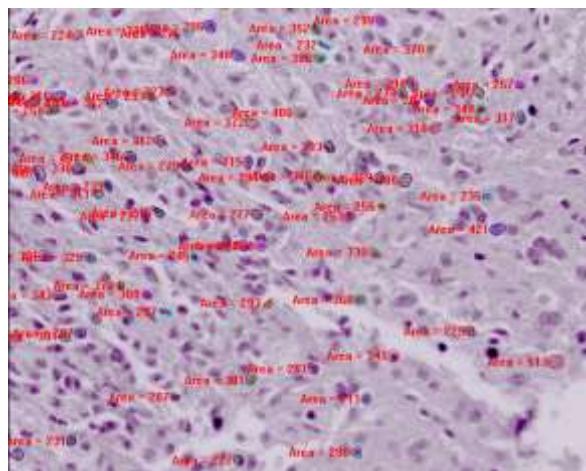


Figura 6. Fotomicrografia de formação adrenocortical submetida a avaliação cariométrica, evidenciando o delineamento das estruturas nucleares mediante o uso do cursor e mensuração com software Metamorph®.

A partir desses dados, foram obtidos os valores médios para cada parâmetro dentro de cada espécie, comparando-se processos histologicamente benignos e malignos. Nos cães, o valor médio encontrado para a área nuclear, respectivamente, em lesões benignas e malignas, foi de 500,2 e 700,1 pixels (figura 7). Para o

perímetro nuclear, os valores médios foram, respectivamente, de 79,2 e 90,8 pixels (figura 8). Com o uso do teste t de Student foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os grupos, com $p < 0,0001$.

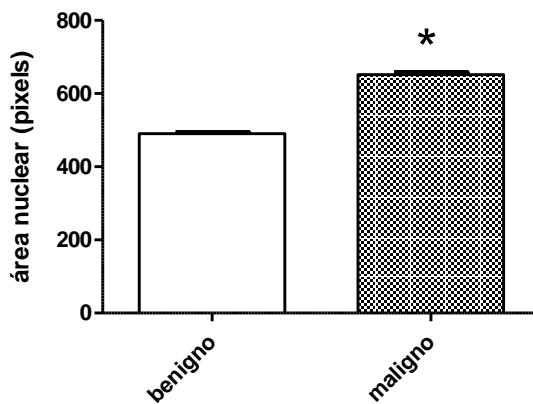


Figura 7. Gráfico apresentando o valor médio da área nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães (* $p < 0,0001$, teste t de Student).

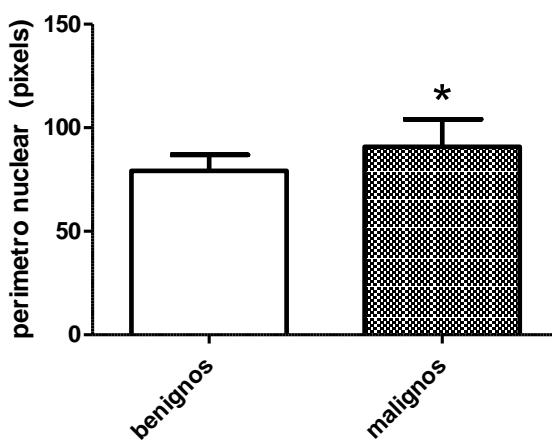


Figura 8. Gráfico apresentando o valor médio do perímetro nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães (* $p < 0,0001$, teste t de Student).

Para os furões o valor médio de área nuclear, nos casos benignos, foi de 446,4 pixels e de 765,4 pixels nos malignos (figura 9). Já para o perímetro nuclear os valores médios, foram respectivamente, em formações benignas e malignas, de 75,88 e 98,60 pixels (figura 10). Em ambas as condições com o emprego do teste t de Student foi identificada diferença estatisticamente significante entre os grupos, com $p < 0,0001$.

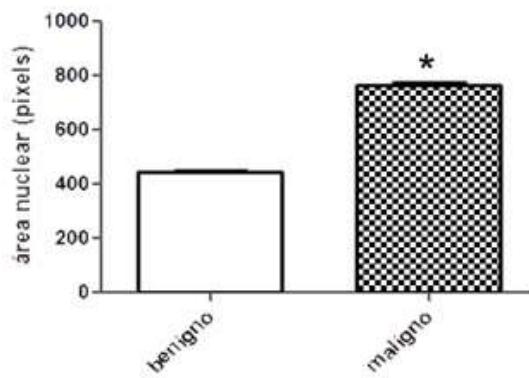


Figura 9. Gráfico apresentando o valor médio da área nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em furões (* $p<0,0001$, teste t de Student).

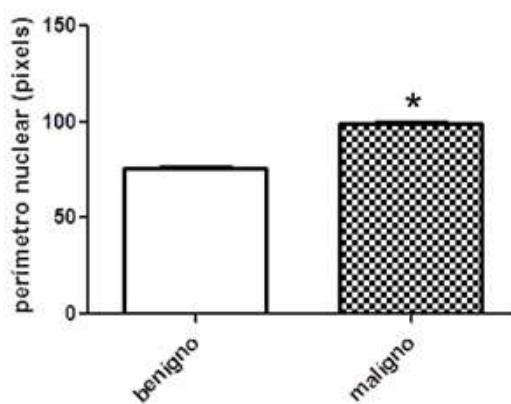


Figura 10. Gráfico apresentando o valor médio do perímetro nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em furões (* $p<0,0001$, teste t de Student).

DISCUSSÃO

A glândula adrenal humana está organizada em uma área cortical de origem mesodérmica e uma área medular de origem ectodérmica. O primórdio cortical deriva de uma ampla placa de epitélio celômico na região mais interna do blastema mesonéfrico, entre a raiz mesentérica e o primórdio gonadal. Progressivamente se desenvolve a sua compartimentalização, correspondendo a uma região cortical externa e um medular interna (Barwick et al, 2005). A maior extensão é ocupada pela primeira, organizada em três zonas, respectivamente, de fora para dentro: glomerulosa, composta por pequenas células angulares, produtora de aldosterona; fasciculada, constituída por células ricas em lipídeos dispostas em colunas, com atividade secretora de glicocorticoides e reticulada, caracterizada por células acidofílicas agrupadas em cordões em meio à vasos sinusoidais, vinculada à síntese principalmente de hormônios androgênicos (McNicol, 2011).

Em cães a microestrutura glandular é semelhante. Já em furões a região cortical é completada por uma camada adicional, a zona intermédia, localizada entre as zonas glomerulosa e fasciculada (Holmes, 1961). Caracteristicamente, a ampla maioria das lesões nodulares adrenais deriva da região cortical (Labelle et al, 2004). Embora sem clara distinção entre elas, nas lesões adrenocorticiais examinadas neste estudo as células exibiram morfologia próxima à observada em componentes das zonas fasciculada e reticulada.

Nódulos adrenocorticiais são achados frequentes na espécie humana, com prevalência de 4% nas necropsias em geral (Kloos et al. 1995). As tumorações adrenocorticiais são infreqüentes nas espécies domésticas, sendo detectadas em 0,17% a 0,76% dos cães domiciliados (Myers, 1997). Embora não seja referida predisposição racial, Cook et al., 2014 referem maior prevalência de processos hiperplásicos em cães de raças pequenas. Em nossa amostragem todas as lesões de animais com raça definida foram provenientes de cães com esse perfil.

Nos furões foi caracterizado um aumento de afecções adrenocorticiais em animais submetidos à gonadectomia, contribuindo para que as neoplasias de natureza endócrina sejam as mais freqüentes, chegando a até 53% das neoplasias diagnosticadas na espécie (Antinoff et al. 2004). As células produtoras de esteróides do córtex adrenal e das gônadas derivam de progenitores comuns do trato urogenital no embrião. Nos furões castrados a perda da produção esteroidal

gonadal resulta em perda da inibição do GnRH hipotalâmico e aumento de liberação de LH hipofisário. A estimulação crônica às células adrenocorticiais resulta em elevação na síntese de esteróides pela adrenal, determinando hiperplasia adrenocortical e finalmente tumorigênese, sugerindo uma sequência patogênica: hiperplasia→adenoma→carcinoma (Diaz-Cano et al, 1993). Essa hipótese é corroborada a partir da evidencia da expressão de LHR em adrenais de furões e a resposta positiva ao teste de estimulação pelo GnRH em furões castrados portadores de tumores adrenocorticais (Schoemaker et al. 2002).

Em termos diagnósticos o principal desafio relacionado às formações adrenocorticais vincula-se à distinção entre quadros benignos (hiperplasias e adenomas) e malignos (carcinomas). Classicamente critérios histológicos são empregados com essa finalidade, admitindo-se, porém, a frequente sobreposição de achados entre condições limítrofes, fato que compromete a sua precisão (Labelle et al. 2004). Alguns parâmetros morfológicos foram correlacionados a evolução clínica dos pacientes com tumores adrenocorticais, sendo estabelecido seu valor prognóstico (Weiss, 1984). A diferenciação entre hiperplasias e adenomas oferece menor relevância clínica, sendo por isso agrupados, para a avaliação cariométrica, conjuntamente em nosso estudo.

Com o propósito de otimizar a distinção entre processos benignos e malignos, diferentes abordagens têm sido utilizadas buscando maior qualidade diagnóstica e informações prognósticas. A pesquisa de moléculas classicamente associadas à tumorigênese, como expressão de p53, p21, mdm-2 não revelou caráter prognóstico (Stojadinovic et al, 2003). Outros parâmetros têm se revelado mais promissores, como a avaliação da densidade microvascular lesional, considerando componentes linfáticos e sanguíneos (Pereira et al, 2017), a mensuração da atividade proliferativa no tumor, a partir da imunomarcação de Ki-67 (Ciaramella et al, 2017; Labelle et al. 2004), e da expressão de moléculas de adesão, investigando a presença de N-caderina nas células neoplásicas (Rubin et al, 2016). Também a presença de enzimas com atividade sobre a matriz extracelular, em especial elementos da família das metaloproteinases, tem sido explorada (Volante et al, 2006).

Um percurso em expansão relaciona-se a análises de DNA, evidenciando a migração da poli para a monoclonalidade à medida que transitamos de nódulos hiperplásicos para lesões neoplásicas. Lesões monoclonais benignas se apresentam, histologicamente, como adenomas, cursando em geral com inibição da

apoptose e estimulação da atividade proliferativa celular, promovendo uma reação estromal associada à neovascularização (Diaz-Cano et al, 2001).

Os carcinomas adrenocorticais, independentemente da espécie, são condições raras, apresentando elevada agressividade biológica, sendo usualmente fatais, em grande medida por serem, em geral, identificados em fases evolutivas avançadas do processo (Else et al. 2014). Nestes, as alterações de ploidia são progressivas, com direcionamento para tetraploidia e escassez de células diploides (Blanes et al, 2006).

Uma modalidade importante de investigação em anatomia patológica é a morfométrica, com o uso crescente em razão do avanço tecnológico, combinando a utilização de sistemas de captura de imagens a softwares específicos (Andrea et al, 2008). Neste estudo, para a caracterização morfométrica, as lesões foram agrupadas em benignas e malignas. Assim, no primeiro grupo, foram reunidos processos hiperplásicos e adenomatosos, dada a similaridade morfológica e ao comportamento biológico comum entre eles. Em geral exibiram maior uniformidade em padrão nuclear, tanto em termos de dimensão quanto de formato. Em contrapartida, nos processos malignos, em ambas as espécies, identificou-se aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose, com núcleos predominantemente vesiculares. Cumpre-nos observar que, ao menos na espécie humana, atipias nucleares isoladamente não são consideradas um indicador confiável de malignidade (Bostwick & Eble 1997).

Considerando a grande heterogeneidade cariotípica em tumores avançados, associada à adequação das células a novas influências microambientais quando em sítios secundários de colonização (McGranahan & Swanton, 2014), optou-se neste estudo, pela consideração de carcinoma adrenocortical eutópico e formação metastática hepática como lesões independentes.

Os dados morfométricos obtidos, representados por área e perímetro nucleares, evidenciaram diferença estatisticamente significante entre lesões benignas e malignas adrenocorticais em furões e cães, seguindo a relação conhecida entre núcleos menores/menor agressividade, e núcleos maiores/maior agressividade. Esses achados reforçam a relação biológica entre arquitetura nuclear e função celular. Características nucleares são correlacionáveis ao comportamento biológico em outras condições oncológicas, como em carcinomas espinocelulares humanos (Bartels et al., 2012), formações adrenocorticais em humanos (Diaz-Cano

et al, 1993), e mastocitomas caninos (Strefezzi et al. 2003). Em particular a avaliação cariométrica mostrou-se relevante na distinção entre lesões adrenocorticais benignas e malignas em humanos porém com a possibilidade de eventual sobreposição morfométrica, sugerindo-se seu emprego como método complementar (Scarpelli et al, 1999).

Nesse sentido, nossos achados sinalizam para a validade do emprego da cariometria na interpretação de amostras adrenocorticais, possível tanto em amostras histopatológicas quanto citológicas. Na literatura está bem fundamentada a adequação da citologia na identificação de formações adrenocorticais, e a possibilidade da sua diferenciação de feocromocitomas (Bertazzolo et al, 2014). Porém, ainda não foram caracterizadas formas seguras de distinção citológica entre expansões adrenocorticais benignas e malignas (Niemann, 2012).

Nosso estudo evidenciou grandes similaridades morfológicas entre lesões proliferativas adrenocorticais de furões e cães, apresentando convergência com os achados em formações análogas humanas, indicando a utilidade do emprego desses processos como modelos em patologia comparada.

CONCLUSÃO

Os achados deste estudo reforçam a relação biológica entre arquitetura nuclear e função celular, sinalizando para o potencial emprego da cariometria no diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas de córtex adrenal.

REFERÊNCIAS

- Andrea C.E., Bleggi-Torres L.F., Alves M.T.S; 2008. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagens. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 44: 51-57.
- Antinoff N., Hahn K. 2004. Ferret oncology: diseases, diagnostics, and therapeutics. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 7: 579-635.
- Bartels P.H. & Bartels H.G. 2012. Karyometry of nuclear phenotypes in cutaneous squamous cell cancer. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 34: p.1-8.
- Bartels P.H., Montironi R., Scarpelli M., Bartels H.G., Alberts D.S. 2009. Knowledge discovery processing and data mining in karyometry. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 31: p. 125-136.
- Barwick T.D.; Malhotra A.; Webb J.A.W.; Savage M.D.; Reznek R.H. 2005. Embryology of the adrenal glands and its relevance to diagnostic imaging. *Clin. Radiol.* 60: 953-959.
- 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. *Vet. Clin. Pathol.* 43: p. 453-459.
- Blanes A., Diaz-Cano S.J. 2006. DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative activity. *Hum. Pathol.* 37: 1295-1303.
- Bostwick & Eble 1997. *Urologic Surgical Pathology*, Mosby, St Louis, p. 746-763.
- Ciaramella P.D., Vertemati M., Petrella D, Bonacina E., Grossrubatscher E., Duregon E., Volante M., Papotti M., Loli P. 2017. Analysis of histological and immunohistochemical patterns of benign and malignant adrenocortical tumors by computerized morphometry. *Pathol.- Res. Pract.* 213: 815-823.
- Cook A. K., Spaulding K. A., Edwards J. F. 2014. Clinical findings in dogs with incidental adrenal gland lesions determined by ultrasonography: 151 cases (2001-2010). *J. A. M. A.* 44: 1181-1185.

- Díaz-Cano S., de Miguel M., Blanes A., Galera-Davidson H., Wolfe H.J. 2001. Contribution of the microvessel network to the clonal and kinetic profiles of adrenal cortical proliferative lesions adrenal. *Virchows Archiv A.* 423: p. 323-328.
- Díaz-Cano S., González-Cámpora R., Ríos-Martín J.J., Lerma-Puertas E., Jordà-Heras M., Vázquez-Ramírez F., Bibbo M., Galera-Davidson H. 1993. Nuclear DNA patterns in adrenal cortex proliferative lesions. *Hum. Pathol.* 32: p. 1232-1239.
- Else T., Kim A.C. Sabolch A., Raymond V.M., Kandathil A., Caoili E.M., Jolly S., Miller B.S., Giordano T.J., Hammer G.D. 2014 Adrenocortical carcinoma, *Endocr. Rev.* 35: 282-326.
- Fischer AH, Bardarov S. Jr, Jiang Z. 2004. Molecular aspects of diagnostic nucleolar and nuclear envelope changes in prostate cancer. *J. Cell Biochem.*, v. 91: p. 170-184.
- Galac S. & Wilson D.B. 2015. Animal models of adrenocortical tumorigenesis. *Endocr. Metab. Clin. North Am.* 44: 297-310.
- Holmes R.L. 1961. The adrenal glands of the ferret, *Mustela putorius*. *J. Anat.* 95: 325-336.
- Kloos R.T., Gross M.D., Francis I.R., Korobkin M., Shapiro B., 1995. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr. Rev.* 16: 460-483.
- Labelle P., Kyles E., Farver T.B., De Cock H.E.V. 2004. Indicators off malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. *Vet. Pathol.* 41: 490-497.
- Libé R. 2015. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Frontiers Cell Develop. Biol.* 3: 1-8.
- Li X., Fox J.G. Neoplastic diseases, 405-448. In: Fox, J.G., *Biology and Diseases of the Ferret*, 2nd ed., Blackwell Publishing, London, 1998.
- McGranahan N., Swanton C. 2014. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell* 27: 125-26.

- McNicol M. 2011. Update on tumours of the adrenal cortex, phaeochromocytoma and extra-adrenal paraganglioma. *Histopathology* 58:155-68.
- Miller B.S., Gauger P.G., Hammer G.D., Giordano T.J., Doherty G.M. 2010. Proposal for modification of the ENSAT staging system for adrenocortical carcinoma using tumor grade. *Langenbecks Arch. Surg.*, v. 395: p. 955-961.
- Myers N.C. 1997. Adrenal incidentalomas. Diagnostic workup of the incidentally discovered adrenal mass. *Vet. Clin. Am. Small Anim. Pract.* 27: 381-399.
- Niemann L.K. 2012. Approach to a patient with adrenal incidentaloma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95: 4106-4113.
- Pagani E., Tursi M., Lorenzi C., Tarducci A., Bruno B., Mondino E,C,B,. Zanatta R. 2016. Ultrasonographic features of adrenal gland lesions in dogs can aid in diagnosis. *BMC Vet. Res.* 12: 267.
- Pereira S.S., Costa M.M., Guerreiro S.G., Monteiro M.P., Pignatelli D. 2017. Angiogenesis and lymphangiogenesis in the adrenocortical tumors. *Pathol. Oncol. Res.*, doi: 10.1007/s12253-017-0259-6.
- Rubin B., Regazzo D., Redaelli M., Mucignat C., Citton M., Iacobone M., Scaroni C., Betterle C., Mantero F., Fassina A., Pezzani R., Boscaro M. 2016. Investigation of N-cadherin/beta-catenin expression in adrenocortical tumors. *Tumor Biol.* 37: 13545-13555.
- Scarpelli M., Montironi R, Mazzucchelli R., Thompson D., Bartels P.H. 1999. Distinguishing cortical adrenal gland adenomas from carcinomas by their quantitative nuclear features. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 21: 131-138.
- Shoemaker N.J., Hoemaker N.J., Schuurmans M., Moorman H., Lumeij J.T. 2000. Correlation between age at neutering and age of onset of hyperadrenocorticism in ferrets. *J. A. V. M. A.* 216: 195-197.
- Schoemaker N.J., Teerds K.J., Mol J.A., Lumeij J.T., Thijssen J.H., Rijnberk A. 2002. The role of luteinizing hormone in the pathogenesis of hyperadrenocorticism in neutered ferrets.. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197:117-25.

- Stojadinovic A., Brennan M.F., Hoos A., Omeroglu A., Leung D.H.Y., Dodas M.E., Nissan A., Cordon-Cardo C., Ghossein R.A. 2003. Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis. *Mod. Pathol.* 16: 742-751.
- Strefezzi R.F., Xavier J.G., Catão-Dias J.L. 2003. Cytologic nuclear morphometry of canine cutaneous mast cell tumors: relationship with histopathological grading. *Vet. Pathol.* 40: 268-275.
- Volante M., Sperone P., Bollito E., Frangipane E., Rosas R., Daffara F., Terzolo M., Berruti A., Papotti M. 2006. Matrix metalloproteinase type 2 expression in malignant adrenocortical tumors: diagnostic and prognostic significance in a series of 50 adrenocortical carcinomas. *Mod. Pathol.* 19: 1563-1569.
- Weiss L.M. 1984. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 8: 163-169.
- Weiss C.A., Scott M.V. 1997. Clinical aspects and surgical treatment of hyperadrenocorticism in the domestic ferret: 94 cases (1994-1996), *J. A. A. H. A.* 33: 487-493.
- Xavier J.G., Mouriño J.M.P. 2011. Índice proliferativo no diagnóstico diferencial de tumores adrenocorticais em furões. *Anais do XV ENAPAVE*, Goiânia, Brasil.
- Zaidi S.K., Young D.W., Javed A., Pratap J., Montecino M., van Wijnen A., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S. 2007. Nuclear microenvironments in biological control and cancer, *Nature Rev. Cancer* 7: 454-463.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Casos de lesões adrenocorticais de cães, relacionando-se a raça, gênero, idade e diagnóstico.	11
Quadro 2. Casos de lesões nodulares adrenocorticais em furões, considerando gênero, idade e diagnóstico.	12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostra de lesão nodular adrenocortical em cão, diagnosticada como adenoma (seta)	12
Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de formação adrenocortical benigna de furão (<i>Mustela putorius furo</i>), evidenciando expansão em agregados coesos, apresentando núcleo ovalado e citoplasma microvacuolizado, delimitados por delicado estroma, composto por fibras reticulares (setas) (hematoxilina-eosina, 40x).	13
Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de formação em adrenal de furão (<i>Mustela putorius furo</i>) exibindo estrutura capsular (seta) (hematoxilina-eosina, 40x).	14
Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de formação adrenocortical de cão compatível com carcinoma, apresentando anisocariose e incremento mitótico com atipias (seta). (hematoxilina-eosina, 40x).....	14
Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma adrenocortical de cão embolizando vaso sanguíneo (seta) (hematoxilina-eosina, 40x).....	15
Figura 6. Fotomicrografia de formação adrenocortical submetida a avaliação cariométrica, evidenciando o delineamento das estruturas nucleares mediante o uso do cursor e mensuração com software Metamorph®.....	15
Figura 7. Gráfico apresentando o valor médio da área nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães (* p<0,0001, teste t de Student).	16
Figura 8. Gráfico apresentando o valor médio do perímetro nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em cães (* p<0,0001, teste t de Student).	16
Figura 9. Gráfico apresentando o valor médio da área nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em furões (* p<0,0001, teste t de Student).....	17
Figura 10. Gráfico apresentando o valor médio do perímetro nuclear em lesões adrenocorticais benignas e malignas em furões (* p<0,0001, teste t de Student)....	17