



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ARLETE BENTA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, DA PROLIFERAÇÃO E DA  
DENSIDADE CELULAR DO ESTROMA OVARIANO DE  
CADELAS COM E SEM NEOPLASIA MAMÁRIA**

ARLETE BENTA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, DA PROLIFERAÇÃO E DA  
DENSIDADE CELULAR DO ESTROMA OVARIANO DE  
CADELAS COM E SEM NEOPLASIA MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - área de concentração: Sanidade Animal - da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S729a Souza, Arlete Benta de.  
Avaliação da morfologia, da proliferação e da densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária / Arlete Benta de Souza. – Londrina, 2011.  
64f:il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Ovários – Tecido conjuntivo – Tumores. 3. Mamas – Tumores – Teses. 4. Células cancerosas – Proliferação – Teses. 5. Tumores em animais – Teses. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.7

ARLETE BENTA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, DA PROLIFERAÇÃO E DA  
DENSIDADE CELULAR DO ESTROMA OVARIANO DE CADELAS  
COM E SEM NEOPLASIA MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – área de concentração: Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giovana Wingeter Di Santis  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Isabel Mello Martins  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro  
Bracarense  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 16 de setembro de 2011.

*Dedico il mio amore perché io non grido alla separazione, in quanto si tratta di una formalità in modo che possano vivere una emozione unica del viaggio: la reunion ...*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, a inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, pela energia fornecida a minha vida.

Aos meus amados pais, *Adolfo e Doretéa*, por todo amor, dedicação e apoio doados ao longo de minha caminhada. Obrigada por estarem sempre muito presentes em todos os momentos dessa minha jornada.

Aos meus irmãos *Cláudia, Cleia e Junior*, a minha cunhada *Adriana* e os meus sobrinhos *Diego, Daniele, Leonardo e Maria Clara* pela compreensão nos meus momentos de ausência durante este período.

À *Profª. Ana Paula F. R. L Bracarense* por acreditar na minha capacidade de realizar o trabalho a mim proposto e ao crescimento profissional adquirido durante esse desafio.

Ao *Dr. Hercílio Fronza Júnior* por permitir a minha ausência no laboratório para a realização do mestrado e por mostrar-me o quanto a patologia é fascinante quando nos dedicamos a ela.

Às *Drª. Rosemary A. Camilo e Drª. Maria Cristina de Carvalho* pela amizade, pelos conselhos e estímulos nos momentos de exaustão devido ao acúmulo de sonhos a realizar.

Ao amigo *Rogério Anderson Marcasso* pela ajuda sempre a mim dispensada, pelo carinho e paciência com “um ser que ovários”.

Aos amigos *Daniele Garcia, Elaine Kuroki Anzai, Rosângela Rodrigues de Souza e Valmor de Souza* pela amizade, paciência, críticas e companheirismo durante mais essa “turbulenta” fase da minha vida.

A amiga e colega de pesquisa *Carla Werlang Coelho* pelo incentivo e ajuda na parte “filosófica” da pós-graduação e da pesquisa.

Aos residentes da Patologia Animal *Rita de Cássia Lima Ribeiro, Raquel Beneton Ferioli, Danilo Gouveia Wasques e Elisângela Olegário da Silva* pela receptividade e pela colaboração nas coletas e no processamento das amostras.

Às colaboradoras *Salete Fernandes, Jucélia Lima e Lolita de Araújo* pela dedicação e cuidados no preparo das minhas inúmeras lâminas.

Aos colegas *Rodrigo Blasius e Nayara Lourenço* pela ajuda e apoio na realização das inúmeras tentativas no método de imunoistoquímico.

Aos residentes da Teriogenologia de Animais de Companhia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina – UEL, e aos alunos da disciplina de Técnica cirúrgica da Universidade Regional de Blumenau – FURB, pela coleta do material para minha pesquisa.

Aos meus filhotes e companheiros *Aretha Cristina e Gordo Elpidio* pelo carinho dispensado através de brincadeiras nos momentos de estudo e de descontração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina- PR.

Ao Centro de Diagnósticos Anátomo Patológicos (CEDAP) e ao Serviços Integrados de Patologia (SIP), Joinville- SC.

A todas as pessoas, amigos e colegas, que estiveram presentes durante esta fase de conquista.

SOUZA, A.B. **Avaliação da morfologia, da proliferação e da densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária.** 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

O ovário é um órgão pluralista e dinâmico, composto por diferentes linhagens de células. As estruturas que o compõem sofrem mudanças sequenciais na morfologia e nas propriedades bioquímicas durante o ciclo reprodutivo, em decorrência da ação de hormônios hipofisários e ovarianos. Os receptores de estrógenos e de progesterona são detectados nos ovários de diversas espécies, indicando que esses hormônios exercem funções autócrina e parácrinas no órgão. Além de regular a função ovariana, os esteróides possuem um importante papel no desenvolvimento dos tecidos uterino e mamário. Na oncologia, inúmeros estudos são realizados na busca do esclarecimento da carcinogênese mamária e ovariana, e é forte a evidência que um dos fatores que favorecem a progressão da neoplasia é a exposição frequente dos tecidos a hormônios esteróides, colaborando assim no desenvolvimento e progressão do tumor. A cadela é utilizada em estudos de carcinogênese mamária devido às similaridades morfológicas e moleculares com as neoplasias em mulheres e as características da fase lútea do ciclo ovariano da cadela, transformando-a assim, em um modelo adequado aos estudos da ação dos hormônios ovarianos na fisiologia e carcinogênese dos órgãos reprodutores e da glândula mamária. São poucos e recentes os estudos sobre o ovário canino, sendo que a maioria aborda aspectos funcionais e hormonais, principalmente sobre células da granulosa e oócitos, com ênfase na reprodução. Pouco se conhece sobre o estroma ovariano de cadelas e mulheres. Atualmente, observa-se um maior interesse a respeito das células que compõem o estroma de tecidos neoplásicos, principalmente mamário, para esclarecer a possível ação autócrina e parácrina dessas células na tumorigênese. O presente estudo teve como objetivo avaliar a morfologia, a proliferação e a densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária. Utilizaram-se blocos histológicos de ovários de 40 cadelas com neoplasia mamária submetidas à ovariossalpingoisterectomia terapêutica e 18 blocos de ovários de cadelas híginas submetidas à cirurgia eletiva. As análises morfológicas do ovário e principalmente do estroma ovariano foram realizadas utilizando as colorações histoquímicas de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson e o método imunoistoquímico com o anticorpo anti-PCNA. A densidade e proliferação celular foram analisadas no estroma

próximo aos folículos terciários. Nos ovários examinados não foram observadas alterações histológicas. Assim, concluiu-se que o método imunoistoquímico PCNA permitiu uma melhor visualização das características histológicas, da composição e disposição das células, do estroma ovariano quando comparado com as colorações histoquímicas de hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson. O estroma ovariano das cadelas é composto predominantemente por células fusiformes e epitelióides em proporções semelhantes. Constatou-se que o índice de proliferação e a densidade celular do estroma ovariano não sofrem alterações em cadelas com e sem neoplasia mamária ou em decorrência ao porte físico do animal. Verificou-se um aumento significativo na densidade celular do estroma ovariano de cadelas com neoplasia entre a faixa etária de 4 a 12 anos em relação às cadelas com idade entre 13 a 15 anos. Neste estudo, observou-se que nos ovários histologicamente normais não há influência e alteração das células estromais ovariana na carcinogênese mamária.

**Palavras-chaves:** Ovário. Neoplasia mamária. Proliferação celular. Densidade stromal. PCNA.

SOUZA, A.B. **Evaluation of the morphology, proliferation and cell density of ovarian stroma of bitches with and without mammary neoplasia.** 2011. 64p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

### **ABSTRACT**

The ovary is a pluralistic and dynamic organ composed of different cell lines. The structures that comprise suffer sequential changes in morphology and biochemical properties during the reproductive cycle, due to the action of hipofisary and ovarian hormones. Estrogen receptors and progesterone levels are detected in the ovaries of several species, indicating that these hormones exert autocrine and paracrine functions in the organ. In addition to regular ovarian function, steroids have an important role in the development of uterine and breast tissues. In oncology, many studies are conducted in search of enlightenment of breast and ovarian carcinogenesis, and is strong evidence that one of the factors that favor the progression of cancer is the frequent exposure of tissues to steroid hormones, thus fostering the development and progression of the tumor. The canine is used in studies of mammary carcinogenesis because of morphological and molecular similarities with the cancers in women and the characteristics of the luteal phase of the ovarian cycle of the bitch, thus transforming it in an appropriate model to study the action of ovarian hormones on the physiology and carcinogenesis of the reproductive organs and mammary gland. Are few and recent studies on the canine ovary, most of which addresses functional and hormonal aspects, especially on granulosa cells and oocytes, with emphasis on reproduction. Little is known about the ovarian stroma of women and bitches. Currently, there is a greater concern as the cells that make up the stroma of neoplastic tissues, especially breast, to clarify the possible autocrine and paracrine action of these cells in tumorigenesis. The present study was to evaluate the morphology, proliferation and cell density of ovarian stroma of bitches with and without breast cancer. We used histological blocks from the ovaries of 40 bitches with breast cancer undergoing treatment ovarioisterectomy and 18 blocks from the ovaries of healthy dogs undergoing elective surgery. The morphological analysis of the ovary and the ovarian stroma were mainly carried out immunohistochemical staining using hematoxylin-eosin and Masson's trichrome and immunohistochemistry with anti-PCNA. The density and cell proliferation were analyzed in the stroma close to tertiary follicles. In the ovaries were not examined histological changes. Thus, it was concluded that PCNA immunohistochemistry allowed a better visualization of the histological characteristics, composition and arrangement of cells, the ovarian stroma when compared with the histochemical staining with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. The ovarian stroma bitches is composed predominantly of spindle cells and epithelioid cells in similar proportions. It was found that the rate of proliferation and cell density of ovarian stroma remain unchanged in dogs with and without breast cancer or due to the physical size of the animal. There was a significant increase in stromal cell density of bitches with ovarian cancer between the ages of 4 to 12 years in relation to dogs aged 13 to 15 years. In this study, we found that histologically normal ovary no influence and alteration of the ovarian stromal cells in mammary carcinogenesis.

**Keywords:** Ovary.Breast cancer.Cell proliferation.Stromal density. PCNA.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Fotomicrografias da região superficial do ovário canino. A) Superfície ovariana revestida por células germinativas. Invaginação do epitélio superficial (asterisco) com a formação dos túbulos corticais (setas). PCNA. Objetiva de 20x. B) Superfície ovariana constituída por epitélio cúbico simples a pavimentoso. Invaginação do epitélio superficial com formação de aspecto papilar (asterisco). PCNA. Objetiva de 20x. Londrina, 2011..... 16
- Figura 2** – Fotomicrografias da região cortical do ovário canino. A) Túnica albugínea (barra preta). HE. Objetiva de 20x. B) Túnica albugínea (barra branca) composta por tecido conjuntivo denso. Tricrômico de Masson. Objetiva de 40x. Londrina, 2011 ..... 16
- Figura 3** – Fotomicrografias do estroma ovariano de cadela. A) Células intersticiais epitelióides – pequenas, com citoplasma indistinto e núcleo redondo. PCNA. Objetiva de 20x. B) Células intersticiais endócrinas (CE) (seta) formando arranjos em cordões e paliçadas. PCNA. Objetiva de 20x. Londrina, 2011..... 17
- Figura 4** – Fotomicrografias da região medular do ovário canino. A) *Rete ovarii* formada por estruturas reticulares e tubulares. Objetiva de 20x. B) Predomínio de células colunares formando estruturas tubulares. PCNA. Objetiva de 40x. Londrina, 2011 ..... 18
- Figura 5** – Figura ilustrativa da estrutura do ovário de mamíferos. Camada cortical e medular e folículos ovarianos em diversas fases de desenvolvimento..... 19
- Figura 6** – Fotomicrografias de folículos ovarianos de cadela. A) Folículos primordiais (seta vermelha) com oócito e uma camada de células foliculares achatadas e folículo primário (seta amarela) com células foliculares cuboidais. PCNA. Objetiva de 40x. B) Folículo primordial (seta vermelha) e folículos secundários (setas amarelas). PCNA. Objetiva de 40x. C) Folículo terciário caracterizados por várias camadas de célula da granulosa, presença da zona pelúcida (ZP) (seta branca) e do *antrum folliculare* (AF) (seta preta). PCNA. Objetiva de 20x. D) Folículo antral

avanzado ou de Graff. Presença do *cumulus oophorus* (CO) (seta branca), da *coroa radiata* (CR) (seta amarela). Externamente observa-se a disposição de células fusiformes ao redor do folículo, camada da teca interna (CT) (barra). PCNA. Objetiva de 10x. Londrina, 2011..... 21

## ARTIGO

- Figura 1** – Imagens digitalizadas para análise com auxílio do programa Imagem Pró Plus 4.0. A imagem à esquerda demonstra a contagem manual das células. As células reativas para o anticorpo anti-PCNA foram marcadas com círculo vermelho e células não reativas com uma cruz verde. A imagem à direita demonstra a área demarcada para análise (círculo amarelo) da imagem digitalizada na objetiva de 40x. Londrina, 2011..... 40
- Figura 2** – Fotomicrografias do ovário canino. Figuras A, C e E) Análise das estruturas ovarianas (epitélio superficial, folículos e estroma) pelas colorações histoquímicas de HE (A) e Tricrômico de Masson (C) e pelo método imunohistoquímico com anticorpo anti-PCNA (E). Objetiva de 20x. Figuras B, D e F) Análise das células fusiformes (núcleos alongados) e epitelióides (núcleos arredondados) que compõem o estroma ovariano, pelas colorações de HE (B), Masson (D) e reação imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA (F). Objetiva de 40x. Londrina, 2011..... 43
- Figura 3** – Fotomicrografias do estroma ovariano canino. A) Estroma com predomínio de células epitelióides, com núcleo redondo. B) Células endócrinas (CE) formando arranjos em cordões ou paliçadas (seta). PCNA. Objetiva de 40x. Londrina, 2011 ..... 44
- Figura 4** – Porcentagem das células fusiformes e epitelióides que compõem o estroma ovariano das cadelas sem e com neoplasia mamária e nas cadelas distribuídas nos grupos por idade e por porte físico. Londrina, 2011 ..... 45
- Figura 5** – Porcentagem das células fusiformes e epitelióides que compõem o estroma ovariano das cadelas distribuídas aos tipos histológicos de carcinoma complexo, carcinoma simples e carcinoma complexo/carcinoma simples. Londrina, 2011..... 45

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

<b>Tabela 1</b> – Distribuição das neoplasias, quanto ao tipo histológico, nos grupos por idade. Londrina, 2011 .....	41
<b>Tabela 2</b> – Distribuição das neoplasias, quanto ao tipo histológico, nos grupos por porte físico. Londrina, 2011 .....	42
<b>Tabela 3</b> – Quantificação da proliferação e da densidade celular na área total analisada do estroma ovariano do grupo com e sem neoplasia mamária, utilizando método imunistoquímico PCNA (valores de média $\pm$ erro padrão). Londrina, 2011 .....	46
<b>Tabela 4</b> – Quantificação da proliferação e da densidade celular do estroma ovariano dos grupos por idade com neoplasia e do grupo sem mamária, utilizando método imunistoquímico PCNA (valores de média $\pm$ erro padrão). Londrina, 2011 .....	47
<b>Tabela 5</b> – Quantificação da proliferação e densidade celular do estroma ovariano dos grupos por porte físico com neoplasia mamária e do grupo sem neoplasia mamária, utilizando método imunistoquímico PCNA (valores de média $\pm$ erro padrão). Londrina, 2011 .....	47
<b>Tabela 6</b> – Quantificação da proliferação e densidade celular do estroma ovariano dos tipos histológicos mais frequentes nas pacientes oncológicas, utilizando método imunistoquímico de anti-PCNA (valores de média $\pm$ erro padrão). Londrina, 2011 .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EG	epitélio germinativo
TC	túbulos corticais
TA	túnica albugínea
CF	células fusiformes
CI	células intersticiais
CE	células endócrinas
RO	<i>rete ovari</i>
CG	células da granulosa
AF	<i>antrum folliculare</i>
TI	teca interna
TE	teca externa
CO	<i>cumulus oophorus</i>
CR	<i>coroa radiata</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
LH	hormônio luteinizante
ER	receptor de estrógeno
PR	receptor de progesterona
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
AE1/AE3	citoqueratinas
CK 7	citoceratina 7
CK 13	citoceratina 13
PLAP	fosfatase alcalina placentária
NSE	enolase neurônio específica
$\alpha$ SMA	alfa-actina de músculo liso

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
1.1	OVÁRIO – ÓRGÃO DINÂMICO .....	14
1.2	MORFOLOGIA DO OVÁRIO CANINO .....	14
1.3	FOLICULOGÊNESE .....	18
1.4	CONTROLE HORMONAL OVARIANO .....	21
1.5	OVÁRIO CANINO NO MODELO DA CARCINOGENESE MAMÁRIA.....	23
	REFERÊNCIAS .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	OBJETIVO GERAL .....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	35
3.1	“AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, DA PROLIFERAÇÃO E DA DENSIDADE CELULAR DO ESTROMA OVARIANO DE CADELAS COM E SEM NEOPLASIA MAMÁRIA” .....	35
	RESUMO .....	35
	ABSTRACT .....	35
3.1.1	Introdução .....	36
3.1.2	Material e Métodos .....	37
3.1.2.1	Amostras .....	37
3.1.2.2	Processamento histopatológico e imunoistoquímico .....	38
3.1.2.3	Análise morfológica .....	39
3.1.2.4	Análise estatística .....	40
3.1.3	Resultados .....	40
3.1.4	Discussão.....	48
	REFERÊNCIAS .....	50
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>ANEXOS</b> .....	57
	ANEXO A – Lista de reagentes e produtos .....	58
	ANEXO B – Soluções .....	59
	ANEXO C – Protocolos de técnicas .....	63

## 1 REVISÃO DA LITERATURA:

**RESUMO:** O ovário dos mamíferos é um órgão complexo e dinâmico, composto por diferentes linhagens celulares. Abrange estruturas que sofrem mudanças sequenciais na morfologia e nas propriedades bioquímicas durante o ciclo reprodutivo. Em cada fase do ciclo, hormônios hipofisários agem no tecido ovário fazendo com que diferentes tipos celulares passem a sintetizar e secretar hormônios esteróides. Os receptores de estrógenos e de progesterona são detectados nos ovários de diversas espécies, indicando que os hormônios esteróides têm funções autócrina e parácrina no ovário. Contudo, além de regular a função ovariana, os esteróides possuem um importante papel no desenvolvimento das glândulas mamárias. Na oncologia, inúmeros estudos são realizados na busca do esclarecimento da carcinogênese mamária e ovariana, uma vez que a progressão do neoplasma está correlacionada com a frequente exposição dos tecidos a hormônios esteróides. Devido às similaridades morfológicas e moleculares com as neoplasias em mulheres e as características da fase lútea do ciclo ovariano, a cadela é considerada um modelo adequado nos estudos da ação dos hormônios ovarianos na fisiologia e carcinogênese mamária e ovariana. São escassos e recentes os trabalhos sobre o ovário canino e a maioria aborda aspectos funcionais, concentrando-se em estudos com células da granulosa e oócitos. Pouco se conhece sobre o estroma ovariano de cadelas e mulheres. Recentemente, há um aumento das pesquisas sobre as células que compõem o estroma de tecidos neoplásicos, principalmente mamário, com a finalidade de compreender a possível ação autócrina e parácrina dessas células na tumorigênese.

**Palavras chaves:** Ovário. Proliferação celular. Densidade celular. Estroma ovariano. PCNA.

**ABSTRACT:** The mammalian ovary is a complex and dynamic organ composed of different cell lines. It covers structures that undergo sequential changes in morphology and biochemical properties during the reproductive cycle. At each stage of the cycle, the hypophysary hormones act on the ovarian tissue causing different types of cells start to synthesize and secrete steroid hormones. Estrogen receptors and progesterone levels are detected in the ovaries of several species, indicating that steroid hormones have autocrine and paracrine functions in the ovary. However, in addition to regulating ovarian function, steroids have an important role in the development of mammary glands. In oncology, many studies are conducted in search of enlightenment of breast and ovarian carcinogenesis, since the progression of the neoplasm is correlated with the frequent exposure of tissues to steroid hormones. Due to the morphological and molecular similarities with the cancers in women and the characteristics of the luteal phase of the ovarian cycle, the canine is considered an appropriate model in studies of hormone action in ovarian physiology and breast and ovarian carcinogenesis. Are scarce and recent work on the canine ovary and most covers functional aspects, focusing on studies of cells and oocytes. Little is known about the ovarian stroma of women and bitches. Recently, there is a growing body of research on the cells that make up the stroma of neoplastic tissues, especially breast, in order to understand the possible autocrine and paracrine action of these cells in tumorigenesis.

**Keywords:** Ovary. Cell proliferation. Cell density. Ovarian stroma. PCNA.

## 1.1 OVÁRIO – ÓRGÃO DINÂMICO

Nos mamíferos, os ovários são órgãos que exercem função endócrina sintetizando e secretando hormônios e fatores de crescimento e, exócrina com a produção de gametas (McGEE; HSUEH, 2000; DI FIORE, 2001). A dupla função é complementar, interdependente e necessária para o sucesso da reprodução da fêmea (McDONALD, 1989; HAFEZ; HAFEZ, 2000).

O ovário é um dos órgãos mais dinâmicos do organismo e submete-se a remodelações intensas como parte do crescimento, da diferenciação, da ovulação e da luteinização dos folículos ovarianos. A remodelação no tecido ovariano exige alterações no equilíbrio entre os processos de proliferação e de apoptose das células ali presentes (JIANG et al., 2003; BERISHA; SCHAMS 2005).

O ovário da espécie canina (*Canis familiaris*) é considerado uma estrutura complexa, com variações morfológicas, macroscópica e microscópica (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). Estudos são realizados em diversas espécies animais para elucidar mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares do órgão. No entanto, os aspectos morfológicos dos caninos são pouco abordados pelos pesquisadores (NISHIYAMA et al., 1999; VERMEIRSCH et al., 2001a, b).

## 1.2 MORFOLOGIA DO OVÁRIO CANINO

Os ovários nos caninos são compostos por epitélio celômico originário da mesoderme e de células germinativas da endoderme, semelhante ao órgão nas mulheres (AUGHEY; FREY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Anatomicamente estão situados na cavidade abdominal, região sublombar, próximo a 3ª e 4ª vértebras lombares, próximos aos pólos caudais dos rins; estando o ovário direito dorsal ou dorsolateral ao cólon ascendente e o ovário esquerdo entre a extremidade dorsal do baço e o cólon descendente. Tanto os ovários, como os ovidutos e o útero estão fixados às paredes dorsolaterais da cavidade abdominal e à parede lateral da cavidade pélvica por meio dos ligamentos largos do útero (GETTY; GROSMANN, 1986; POPESKO, 1997; KÖNIG; LIEBICH, 2004).

Cranialmente, o ligamento largo do útero prende-se pelo ligamento suspensório do ovário. O ligamento largo é constituído por porções do mesovário, mesosalpinge e mesométrio. O ligamento próprio, que é a continuação caudal do ligamento

suspensor, prende-se à extremidade cranial do corno uterino. O ligamento redondo estende-se caudal e ventralmente ao ligamento largo. O complexo arteriovenoso ovariano localiza-se sobre o lado medial do ligamento largo e estende-se da aorta para o ovário pelas artérias e veias ováricas (GETTY; GROSMANN, 1986; POPESKO, 1997; KÖNIG; LIEBICH, 2004).

Macroscopicamente os ovários apresentam-se como estruturas elipsóides achatadas, envoltas pela *Bursa ovarica* que é composta pelo mesovário distal e mesossalpinge (DYCE, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KÖNIG; LIEBICH, 2004). Apresentam coloração brancacenta a pardo-clara em decorrência do tecido conjuntivo denso que compõem a túnica albugínea que recobre o órgão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

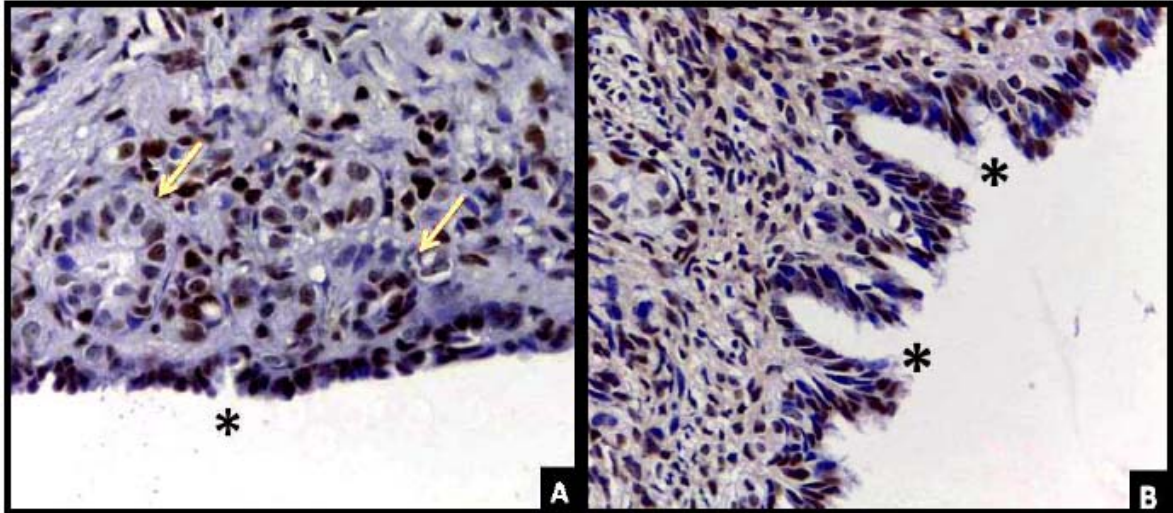
O tamanho dos ovários nos caninos varia com o porte, idade e com o ciclo estral do animal, medindo em média 20 mm de comprimento, 15 mm de largura e 6 mm de espessura (GEOFFREY, 1979; KÖNIG; LIEBICH, 2004).

A porção externa possui a superfície lisa, com saliências formadas pelos folículos ovarianos, destes tendo origem os oócitos, que na fase do estro são eliminados e captados pelas franjas das tubas uterinas, sendo então levados por cílios para o interior do útero (GETTY; GROSMANN, 1986; DI FIORE, 2001; KÖNIG; LIEBICH, 2004). A superfície de corte exibe coloração pardo-clara e cavidades císticas de tamanhos variados.

O órgão é constituído por duas porções distintas: região cortical rica em folículos ovarianos ou corpo lúteo envoltos por células estromais e tecido conjuntivo; e a região medular ou interna que é composta por nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e células hilares (intersticiais) de permeio ao tecido conjuntivo frouxo (PRIEDKALNS; LEISER, 1998; AUGHEY; FREY, 2001; DI FIORE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A superfície do ovário é revestida por epitélio germinativo (EG), originário do mesotélio do peritônio visceral, e pode variar do tipo cúbico simples a pavimentoso (AUGHEY; FREY, 2001; DI FIORE, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004) e exibe um discreto crescimento de aspecto papilar que se invagina para a camada cortical, formando os túbulos corticais (TC) (Figura 1). Estes túbulos são compostos por células cúbicas (Figura 1) sendo evidenciados apenas em ovários de adultos, incluindo a cadela (PRIEDKALNS; LEISER, 1998; AKIHARA et al., 2007).

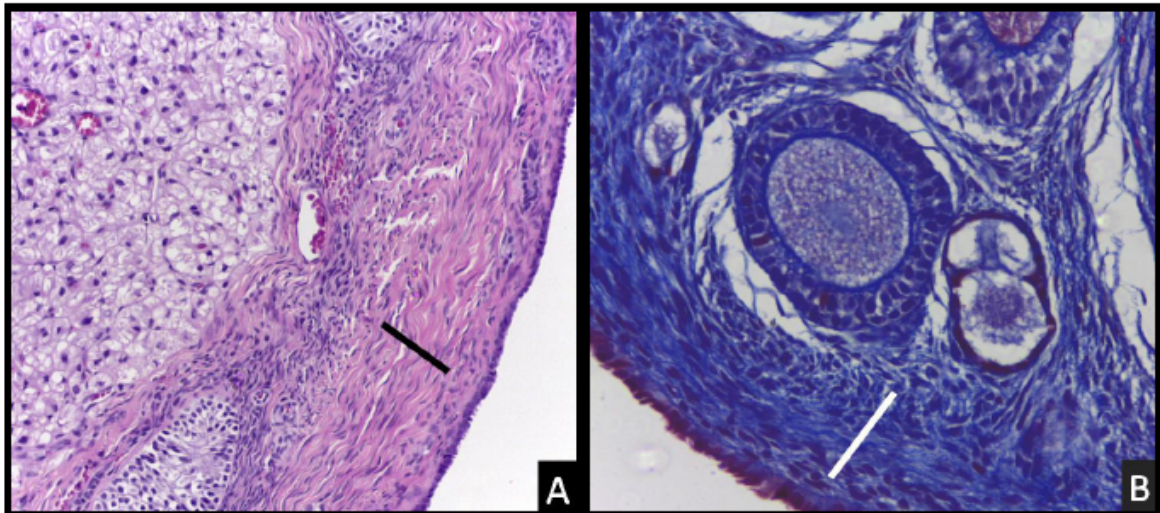
**Figura 1** – Fotomicrografias da região superficial do ovário canino. A) Superfície ovariana revestida por células germinativas. Invaginação do epitélio superficial (asterisco) com a formação dos túbulos corticais (setas). PCNA. Objetiva de 20x. B) Superfície ovariana constituída por epitélio cúbico simples a pavimentoso. Invaginação do epitélio superficial com formação de aspecto papilar (asterisco). PCNA. Objetiva de 20x. Londrina, 2011.



Fotos: Arlete Benta de Souza.

A túnica albugínea (TA), localizada abaixo do epitélio superficial, é uma camada tecido conjuntivo denso composta por fibras colágenas (Figura 2). A densidade celular desta região diminui nas porções seguintes da camada cortical e inúmeros túbulos corticais estão presentes na túnica albugínea (AUGHEY; FREY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; AKIHARA et al., 2007).

**Figura 2** – Fotomicrografias da região cortical do ovário canino. A) Túnica albugínea (barra preta). HE. Objetiva de 20x. B) Túnica albugínea (barra branca) composta por tecido conjuntivo denso. Tricrômico de Masson. Objetiva de 40x. Londrina, 2011.

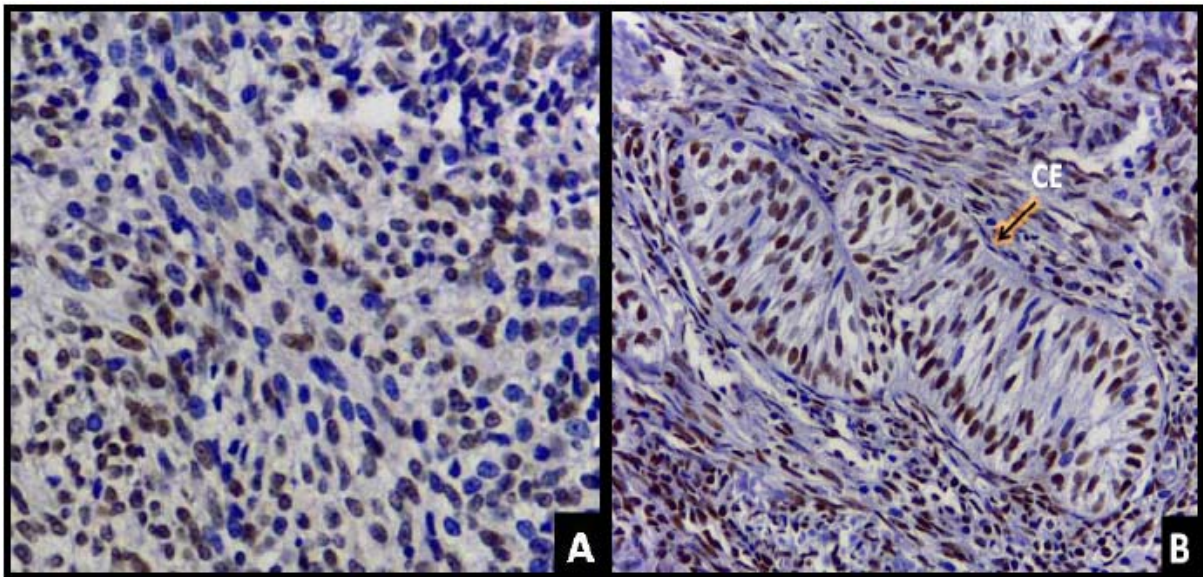


Fotos: Arlete Benta de Souza.

Na região cortical observa-se o predomínio de folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento, compostos por um oócito envolto por uma ou mais camadas de células foliculares ou células da granulosa (CG) (AUGHEY; FREY, 2001; GARTNER; HIATT, 2007).

O estroma ovariano está constituído por fibras colágenas e reticulares, células fusiformes, principalmente fibroblastos, células intersticiais e células endócrinas (CE). As células intersticiais são pequenas, epitelióides, com núcleo redondo (Figura 3A). As CE são poliédricas e formam arranjos em cordões e paliçadas (Figura 3B), sendo também observadas em roedores (PRIEDKALNS; LEISER, 1998; AUGHEY; FREY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GARTNER; HIATT, 2007).

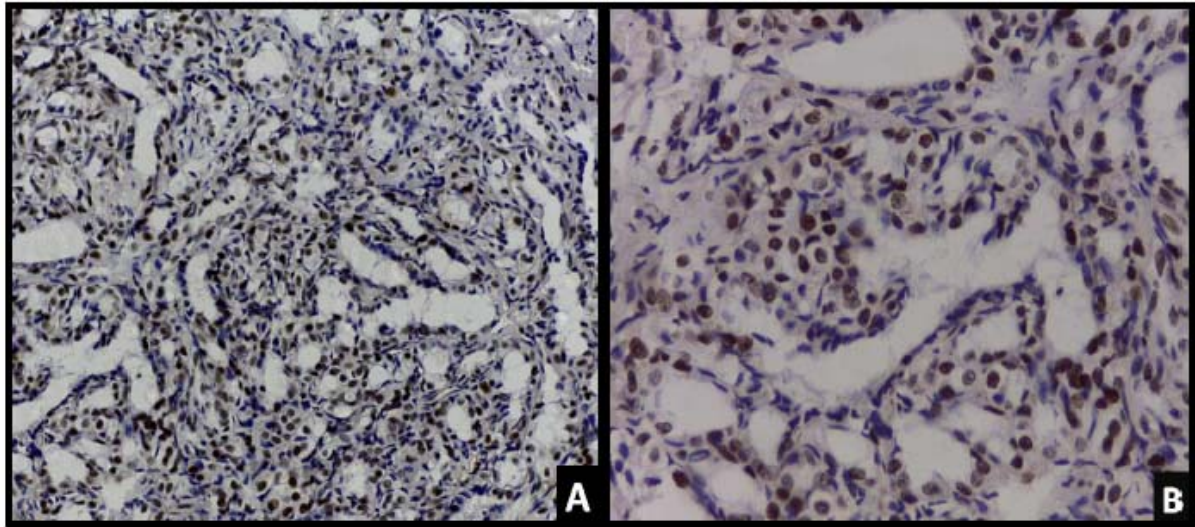
**Figura 3** – Fotomicrografias do estroma ovariano de cadela. A) Células intersticiais epitelióides – pequenas, com citoplasma indistinto e núcleo redondo. PCNA. Objetiva de 20x. B) Células intersticiais endócrinas (CE) (seta) formando arranjos em cordões e paliçadas. PCNA. Objetiva de 20x. Londrina, 2011.



Fotos: Arlete Benta de Souza.

Na região medular, no hilo ovariano, observa-se a *rete ovari* (RO) composta por células cubóides e colunares, entremeada ao estroma composto por tecido fibroelástico e muscular liso. As células cubóides arranjam-se formando estruturas reticulares, enquanto as células colunares formam estruturas tubulares, as quais são mais frequentes nesta região (Figura 4) (AUGHEY; FREY, 2001; AKIHARA et al., 2007).

**Figura 4** – Fotomicrografias da região medular do ovário canino. A) *Rete ovarii* formada por estruturas reticulares e tubulares. Objetiva de 20x. B) Predomínio de células colunares formando estruturas tubulares. PCNA. Objetiva de 40x. Londrina, 2011.



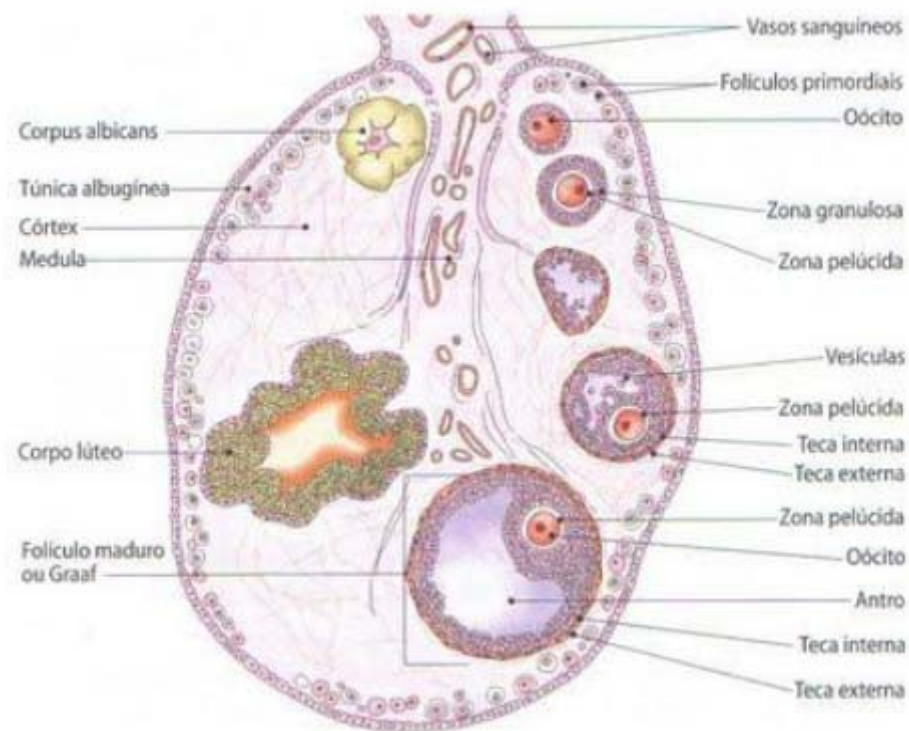
Fotos: Arlete Benta de Souza.

### 1.3 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é caracterizada pela proliferação acentuada e diferenciação das células somáticas dos folículos (ARMSTRONG; WEBB, 1997). Nos caninos, a foliculogênese inicia-se com a formação dos folículos primordiais após o nascimento, ocorrendo entre o 17º e 54º dia de vida (ANDERSEN; SIMPSON, 1973). Os folículos primordiais desenvolvem-se, a partir da puberdade da cadela, sob a influência de hormônios esteróides, liberação de gonadotrofinas, peptídeos e fatores de crescimento, sofrendo modificações e tornando-se estruturas no meio do estroma ovariano (ARMSTRONG; WEBB, 1997; HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Em função da fase de desenvolvimento folicular observam-se características histológicas peculiares, classificando-os em primordial, primário, secundário (pré-antral), antral precoce e antral avançado ou de Graff (Figura 5) (AUGHEY; FREY, 2001; BARBER et al., 2001; SONGSASEN; WILDT, 2005).

**Figura 5** – Figura ilustrativa da estrutura do ovário de mamíferos. Camada cortical e medular e folículos ovarianos em diversas fases de desenvolvimento.



**Fonte:** [blogdebiologia.wordpress.com](http://blogdebiologia.wordpress.com)

O folículo primordial caracteriza-se pela presença do oócito primário cercado por uma única camada de células da granulosa (CG) achatadas, medindo aproximadamente 25 a 40  $\mu\text{m}$  de diâmetro (DURRANT et al., 1998; DOLEZÉL et al., 2003). Tais células foliculares transformando-se cubóides, dando origem ao folículo primário. Com a continuidade da proliferação das CG o epitélio torna-se estratificado (2 a 5 camadas), surge uma camada espessa de material amorfo entre o oócito e a camada interna da CG, a zona pelúcida (BARBER et al., 2001). O folículo passa a ser denominado secundário, com diâmetro de 30 a 100  $\mu\text{m}$  (Figura 6A e 6B). Com o desenvolvimento das CG ocorre a formação de uma cavidade no folículo, o *antrum folliculare* (AF), caracterizando o folículo terciário, que atinge um tamanho entre 102 a 148,9  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Figura 6C) (DURRANT et al., 1998; BARBER et al., 2001; DOLEZÉL et al., 2003). Ao redor de quatro meses os folículos pré-antral e antral são observados no córtex ovariano de cadelas (ANDERSEN; SIMPSON, 1973; DURRANT et al., 1998).

Concomitantemente, a fase secundária da foliculogênese ocorre o desenvolvimento das células do estroma ao redor do folículo, dando origem às camadas da teca interna (TI) e externa (TE) (Figura 6D). As células da TI quando totalmente diferenciadas

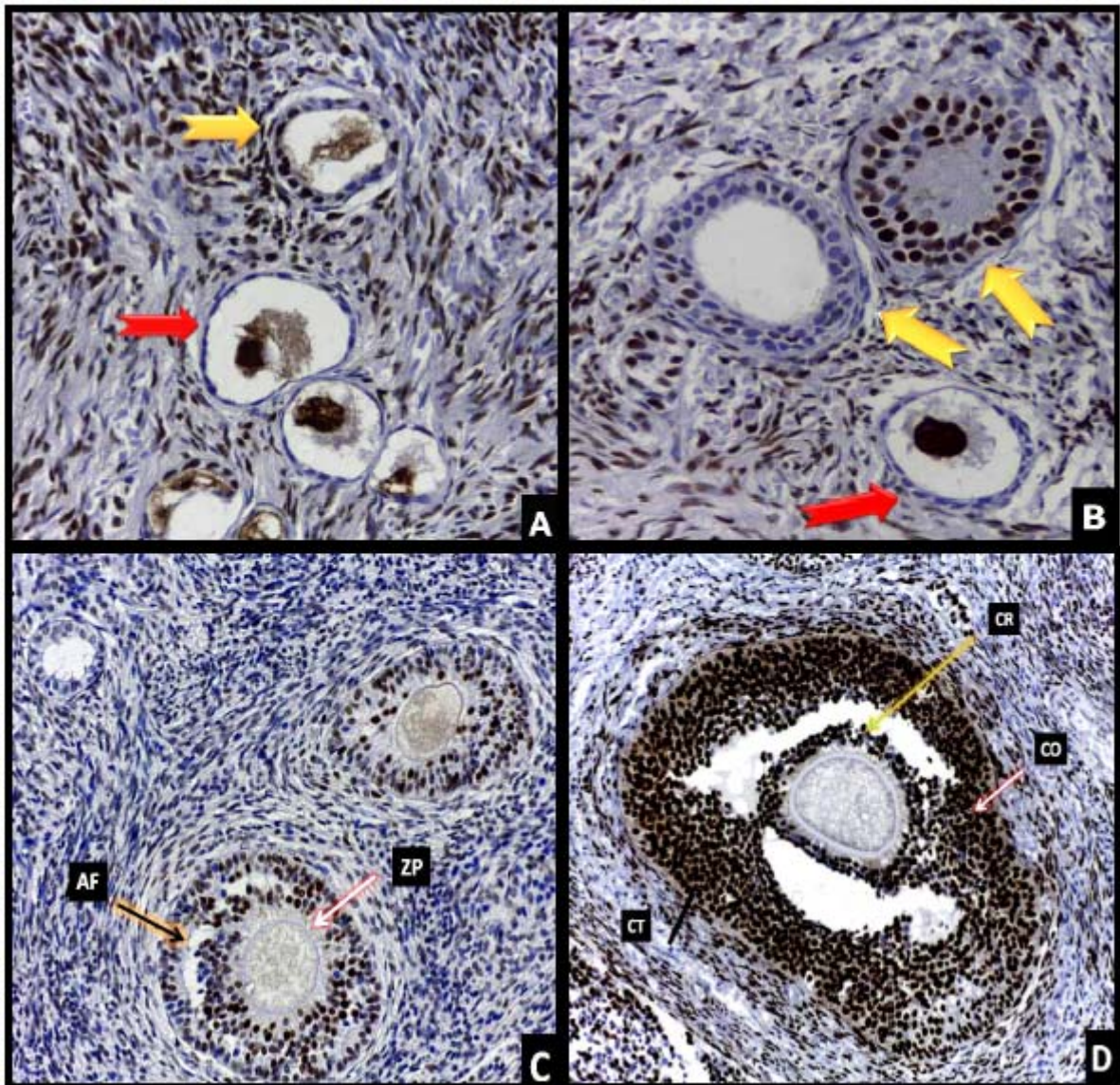
passam a sintetizar hormônios esteróides, principalmente andrógenos (DURRANT et al., 1998; BARBER, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GARTNER; HIATT, 2007). Pequenas células estromais redondas podem acumular-se principalmente ao redor de folículos ovarianos (AUGHEY; FREY, 2001; AKIHARA et al., 2007).

Após o desenvolvimento completo das camadas das tecas (TI e TE), da presença do antro folicular e a reorganização das CG, há o surgimento de um pequeno espessamento na parede do folículo, o *cumulus oophorus* (CO), e algumas células foliculares passam a envolver o oócito constituindo a *coroa radiata* (CR) (Figura 6D).

Quando o folículo atinge seu desenvolvimento máximo, medindo entre 200 a 350 µm de diâmetro, passa a ser denominado de folículo maduro, antral avançado ou de Graff (DURRANT et al., 1998; BARBER et al., 2001; DOLEZÉL et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GARTNER; HIATT, 2007).

Na fase de atresia folicular, a morte celular não é confinada a apenas um tipo específico de célula, mas todo o folículo sofre degradação. O processo de degradação é constituído por um dos mecanismos: apoptose, autofagia ou necrose (van WEZEL; RODGERS, 1996; van WEZEL et al., 1999; D'HAESELEER et al., 2006). Nessa fase as células da camada da TI frequentemente persistem isoladas ou em pequenos grupos no estroma cortical, sendo denominadas de células intersticiais ou de Leydig (AUGHEY; FREY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

**Figura 6** – Fotomicrografias de folículos ovarianos de cadela. A) Folículos primordiais (seta vermelha) com oócito e uma camada de células foliculares achatadas e folículo primário (seta amarela) com células foliculares cuboidais. PCNA. Objetiva de 40x. B) Folículo primordial (seta vermelha) e folículos secundários (setas amarelas). PCNA. Objetiva de 40x. C) Folículo terciário caracterizados por várias camadas de célula da granulosa, presença da zona pelúcida (ZP) (seta branca) e do *antrum folliculare* (AF) (seta preta). PCNA. Objetiva de 20x. D) Folículo antral avançado ou de Graff. Presença do *cumulus oophorus* (CO) (seta branca), da *coroa radiata* (CR) (seta amarela). Externamente observa-se a disposição de células fusiformes ao redor do folículo, camada da teca interna (CT) (barra). PCNA. Objetiva de 10x. Londrina, 2011.



Fotos: Arlete Benta de Souza.

#### 1.4 CONTROLE HORMONAL OVARIANO

O ovário tem sua função controlada pela ação de hormônios hipofisários e ovarianos (HSUEH et al., 2000). Os hormônios esteróides (andrógenos, estrógenos e

progesteronas) produzidos pelo órgão atuam por mecanismos autócrinos e parácrinos modulando o crescimento e a diferenciação folicular, e regulando a esteroidogênese (AINSWORTH et al., 1990).

Os esteróides ovarianos interagem com os hormônios gonadotróficos, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) secretados pela hipófise anterior, por meio de mecanismos de *feedback* negativo no controle da foliculogênese (IWAI et al., 1990; ERICKSON; DANFORTH, 1995).

Os folículos ovarianos encontram-se quiescentes até o início da vida reprodutiva da cadela, que ocorre entre 6º e 24 º mês de idade (FELDMANN; NELSON, 1997; van den HURK; ZHAO, 2005;). Uma vez o animal alcançando a puberdade, os folículos são recrutados por ação de hormônios, e assim, iniciam um curso pré-programado de desenvolvimento, maturação e ovulação ou sofrem atresia (FAIR, 2003). O mecanismo de ação dos hormônios nas células ovarianas ocorre com a ligação e ativação de receptores (BROSENS et al., 2004).

O FSH age nos folículos estimulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa, induz a formação do antro, além de influenciá-las na síntese de estradiol. O LH tem como principal função estimular e controlar a síntese de andrógenos (androstenediona e testosterona) pelas células da teca, além de promover a ovulação e estimular a luteinização das células da granulosa e da teca em folículos pré-ovulatórios (RICHARDS, 1994; McCracken; CUSTER; LAMSA, 1999; McGEE; HSUEH, 2000; van den HURK; ZHAO, 2005).

Os andrógenos sintetizados pelas células da teca são produtos intermediários importantes para a síntese de estrógenos, a qual ocorre pelo processo de aromatização do andrógeno pela ação da enzima p450 aromatase nas células da granulosa (FORTUNE; QUIRK, 1988; FELDMANN; NELSON, 1997). A progesterona é produzida pelas células da granulosa dos folículos maduros e no corpo lúteo, pela secreção de LH (McCracken; CUSTER; LAMSA, 1999), sendo também produzida em menor quantidade por células intersticiais ovarianas (FELDMANN; NELSON, 1997; van den HURK; ZHAO, 2005).

Diversos estudos relatam a presença de receptores de estrógenos (ER) e progesteronas (PR) em ovários (KIM; GREENWALD, 1987 a,b; VESANEN et al., 1991; VESANEN, 1993; ODORE et al., 1999) e esses receptores são expressos nos ovários de cadelas em diferentes fases do ciclo estral (VERSMEIRSCH et al., 2001 a,b). Os receptores de estrógenos são subdivididos em ER $\alpha$  e ER $\beta$  (MARTIN DE LAS MULAS et al., 2004). Nas fêmeas de mamíferos observa-se uma quantidade abundante de ER $\alpha$  na glândula mamária, e

uma alta expressão de ER $\beta$  no ovário (WEIHUA et al., 2003). Nos caninos a expressão de ER foi identificada também no hipotálamo e na hipófise (HATOYA et al., 2003). As células que compõem o estroma respondem aos estímulos de gonadotrofinas e são responsáveis pela produção de hormônios androgênicos (AUGHEY; FREY, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GARTNER; HIATT, 2007).

### 1.5 OVÁRIO CANINO NO MODELO DA CARCINOGENESE MAMÁRIA

A glândula mamária, assim como o ovário, é um órgão complexo, constituída por vários tipos de tecido e de células que se submetem a estágios múltiplos de crescimento, de diferenciação, de atividade secretória e de degenerescência durante a vida da fêmea. O desenvolvimento e atividade funcional das glândulas são dependentes de hormônios ovarianos, como o estrógeno e a progesterona, e da ação coordenada de muitos outros hormônios, incluindo a prolactina, o hormônio de crescimento, os hormônios da tiróide, os glucocorticóides e a oxitocina (COWIE; FORSYTH; HART, 1980; FORSYTH, 1986; MOL et al., 1999; TUCKER, 2000; HELDRING et al., 2007).

A importância dos estudos sobre tumores de mama em cadelas tem aumentado devido à frequência com que os casos surgem na clínica dos animais de companhia e devido às semelhanças que tem com tumores de mama na mulher (FONSECA; DALECK, 2000).

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes em cadelas, sendo que cerca de 50% deles são malignos (DALECK et al., 1998; MORRISSON, 1998; MISDORP, 2002). A maior incidência ocorre na faixa de 8 a 10 anos, podendo animais com menos de 5 anos apresentar tumores malignos (BURINI, 2002). Não existe predisposição racial e as mamas mais acometidas pelos tumores são a 1ª, 2ª e 5ª (DALECK et al., 1998; MORRISSON, 1998).

A transformação neoplásica da glândula mamária é multifatorial, e entre esses estão fatores como: hereditário, obesidade, alimentação com baixo valor nutritivo ou composta por agentes cancerígenos (DALECK et al., 1998; MORRIS; ROGERS, 2000). No entanto, grande parte do desenvolvimento neoplásico é dependente do fator hormonal (JOHNSTON, 1993; MORRIS et al., 1998).

Para a promoção e o desenvolvimento dos tumores mamários faz-se necessária a ação de hormônios ovarianos (estrógeno, progesterona, andrógeno), hipofisários

e hormônios de crescimento, assim como a prolactina (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SCHNEIDER, 1970).

Com inúmeros estudos realizados na busca do esclarecimento da carcinogênese mamária, há forte evidência que um dos fatores que favorecem a progressão dos tumores mamários seja a exposição consecutiva do tecido a hormônios esteróides ovarianos, colaborando assim na promoção e progressão da neoplasia (GUSTAFSSON, 1998; HELDRING et al., 2007; JERRY; DUNPHY; HAGEN, 2010).

Pesquisas são realizadas para identificar fatores de risco e fatores de proteção à ação dos hormônios que agem como promotores da neoplasia mamária (MISDORP; HART, 1976; HELMÉN et al., 1993; PEREZ-ALENZA et al., 2000; RUSSO; RUSSO, 2007; DUNPHY; HAGEN, 2010; BRENNAN, 2010).

Estudos demonstraram que os PR e ER estão presentes tanto no tecido mamário normal como no neoplásico de mulheres e cadelas (RUTTEMAN et al., 1988; RUTTEMAN, 1990; DONNAY et al., 1993, 1995 a), atingindo uma proporção de 95% no tecido normal (DONNAY et al., 1995b), 50% no tecido neoplásico de cadelas (MACEWEN, et al., 1982) e 65-70% no de mulheres (van ZWIWTEN, 1984).

As neoplasias que são induzidas por hormônios esteróides, no entanto, tornam-se geralmente dependentes de altos níveis desses hormônios para sua multiplicação, sendo essa a fase de dependência do tumor. Contudo, toda neoplasia cuja indução tenha ocorrido por suporte hormonal, tende a se tornar autônoma (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SCHNEIDER, 1970).

Devido à similaridade da carcinogênese entre a mulher e a cadela (EVANS; PIERREPOINT, 1975; MONSON; MALBICA; HUBBEN, 1977; HAMILTON; ELSE; FORSHAW, 1977; OWEN, 1979; RUTTEMAN et al., 1988; RUTTEMAN, 1990; RUTTEMAN; MISDORP, 1993; DONNAY et al., 1996; CASSALI, 2000) e às características da fase lútea do ciclo ovariano na cadela, a espécie canina tem se tornado um modelo adequado nos estudos da ação dos hormônios ovarianos na fisiologia e carcinogênese dos órgãos reprodutores e da glândula mamária (GARDEREN; SCHALKEN, 2002; TSAI; CLARK; MURPHY, 2007).

O uso do método de imunistoquímica tornou-se uma importante ferramenta nos estudos morfológicos e patológicos em humanos e animais (AKIHARA et al., 2007). A maioria dos estudos de imunistoquímica no ovário abrange o aspecto morfológico do órgão, caracterizando filamentos (CZERNOBILSKY et al., 1984; CZERNOBILSKY, et al., 1985; KHAN-DAWOOD; YUSOFF DAWOOD; TABIBZADEH, 1996; PÉREZ MARTINEZ et

al., 2001) e também o aspecto funcional, por meio da marcação de receptores hormonais (VERMEIRSCH et al., 2001a, b; AKAHIRA et al., 2002).

Recentemente, Akihara et al. (2007) com auxílio de um amplo painel imunoistoquímico estabeleceu padrões morfológicos e imunoistoquímicos do ovário canino. As células do epitélio superficial são imunorreagentes, com positividade forte, para citoqueratina (AE1/AE3), citoqueratina 13 (CK 13), desmina e enolase neurônio específica (NSE) e moderada para citoqueratina 7 (CK 7), vimentina, calponina e fosfatase alcalina placentária (PLAP). As células que compõem os tubos corticais exibem forte imunomarcação para AE1/AE3, CK 13, vimentina, desmina e NSE e discreta para CK 7, CK 20, calponina e PLAP. A túnica albugínea discreta positividade para a desmina, alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), calponina, proteína S100 (S100) e moderada para a vimentina e NSE. O estroma exibe forte imunomarcação para vimentina, S100 e NSE e moderada para calponina, sendo que as células endócrinas que compõem o mesmo exibem forte positividade para vimentina e  $\alpha$ -inibina, moderada para NSE e discreta para calponina e S100.

Vermeirsch e colaboradores (2001a, b), em dois estudos realizados, constataram que em todas as fases do ciclo ovariano da cadela ocorre uma expressão significativa dos receptores de andrógenos e progesterona nas células estromais e a existência da diferença entre a expressão dos receptores no ovário e concentração sérica de hormônios esteróides. Nos mesmos estudos foi demonstrada a correlação positiva entre a concentração sérica de estradiol e a intensidade da expressão de receptores de andrógenos das células do estroma e da teca interna, sendo negativa na correlação com a progesterona.

A avaliação do potencial proliferativo de células é extremamente importante no conhecimento dos fenômenos relacionados à carcinogênese. A proliferação celular pode ser estimada por meio de métodos imunoistoquímicos, por detecção de proteínas nucleares relacionadas com a replicação do DNA. Alguns marcadores de proliferação como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e Ki-67 são utilizados para essa finalidade (ZUCCARI, 2004), sendo o PCNA utilizado na maioria das pesquisas de ovários (FERANIL; ISOBE; NAKAO, 2004; YOSHIDA et al., 2009; KELSEY et al., 2010).

O PCNA é uma proteína nuclear ácida com peso molecular de 36 kDa, que funciona como co-fator da DNA-polimerase delta e está associada tanto à replicação como ao reparo do DNA (BRAVO; McDONALD-BRAVO, 1987; OYAMA et al., 1995). A proteína está presente em todas as fases do ciclo celular, começando a acumular-se na fase G1, alcançando o nível mais elevado durante a fase S e diminui durante a fase de G2/M do ciclo

celular e possuindo uma meia vida de aproximadamente 20 horas (BRAVO; McDONALD-BRAVO, 1987; McCORMICK; HALL, 1992).

Avanços consideráveis, em estudos realizados em mulheres, sobre a ação dos hormônios esteroidais na regulação da função mamária já foram feitos através da análise morfológica da glândula mamária de pacientes submetidas à ablação dos ovários (NEVILLE; McFADDEN; FORSYTH, 2002). No entanto, os estudos que abordam os aspectos morfológicos e funcionais do ovário em mulheres e cadelas ainda são escassos (NISHIYAMA et al., 1999; VERMEIRSCH et al., 2001a, b). Assim, pesquisas sobre a morfohistologia dos ovários são fundamentais para fornecer informações para a compreensão da fisiologia e sua associação na carcinogênese mamária.

#### REFERÊNCIAS

AINSWORTH, L. et al. The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement, v. 40, p. 137-150, 1990.

AKAHIRA, J. et al. Differential expression of progesterone receptor isoforms A and B in the normal ovary, and in benign, borderline, and malignant ovarian tumors. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 93, p. 807-815, jul. 2002.

AKIHARA, Y. et al. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 495-501, oct. 2007.

ANDERSEN, A.C.; SIMPSON, M.E. **The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle)**. Los Altos: Geron-X, 1973, 290 p.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139-146, sep. 1997.

AUGHEY, E.; FREY, F.L. Female Reproductive System. *In*: \_\_\_\_\_. **Comparative Veterinary Histology with clinical correlates**. London: Manson Publishing. 2001. p. 183-188.

BARBER, M.R. et al. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. **Theriogenology**, v. 1, n. 8, p. 1705-1717, may 2001.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 305-317, aug. 2005.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, p. 1549-1554, oct. 1987.

- BRENNAN, S.F. et al. Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1294-1302, may 2010.
- BROSENS, J.J. et al. Steroid receptor action. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 2, p. 265-283, apr. 2004.
- BURINI, C.H.P. **Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. 2002. 164 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP/Campus de Botucatu, Botucatu, 2002.
- CASSALI, G.D. **Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- COWIE, A., FORSYTH, I.A.; HART, I.C. Hormonal control of lactation. *In*: **Monographs on Endocrinology**. Berlin: Springer-Verlag, v. 15, 1980, 275p.
- CZERNOBILSKY, B. et al. Intermediate filaments of normal and neoplastic tissues of the female genital tract with emphasis on problems of differential tumor diagnosis. **Pathology, Research and Practice**, v. 179, n. 1, p. 31-37, set. 1984.
- CZERNOBILSKY, B. et al. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. **European Journal of Cell Biology**, v. 37, p. 175-190, may 1985.
- DALECK, C.R., FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A.E; MARTINS, M.I.M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p. 95-100, 1998.
- DI FIORE, M.S.H. Ovário. *In*: DI FIORE, M.S.H. **Atlas de Histologia**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 229 p.
- DOLEZÉL, R. et al. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, p. 37-43, feb. 2004.
- DOLEZÉL, R. et al. Follicular population and oestrogen receptor alpha in canine ovaries during the oestrous cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 347, jul. 2003. Abstrac P50
- DONNAY, I. et al. Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumourous canine mammary tissues. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 501-512, 1993.
- DONNAY, I. et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, sep. 1995a.
- DONNAY, I. et al. Changes in the concentrations and aucties of oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor during the oestrus cycle in the normal canine mammary gland and uterus. **Veterinary Research Communications**, v. 19, p. 101-113, 1995b.

- DONNAY, I. et al. Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v. 60, n. 3, p. 251-254, may 1996.
- DURRANT, B.S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 917-932, apr. 1998.
- DYCE, K.M.; Aparelho urogenital, *In*: DYCE, K.M.; WENSING, C.J.G.; SACK, W.O. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: ELSEVIER, 2004, 803p.
- D'HAESELEER, M. et al. Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. **Theriogenology**, v. 65, p. 757-772, mar. 2006.
- ERICKSON, G.F.; DANFORTH, D.R. Ovarian control of follicle development. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 2, part 2, p. 736-757, feb. 1995.
- EVANS, C.R.; PIERREPOINT, C.G. Tissue-steroid interactions in canine hormone dependent tumours. **Veterinary Research**, v. 79, p. 464-467, 1975.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of development competence. **Animal reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.
- FERANIL, J.B.; ISOBE, N.; NAKAO, T. Cell proliferation in the atretic follicles of buffalo and cattle ovary. **Reproduction on Domestic Animals**, v. 36, n. 6, p. 405-409, dec. 2004.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. *In*: DI BRYDEN. **Internal Medicine**. Sydney: The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997. p. 273-288.
- FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 731-735, 2000.
- FORSYTH, I. A. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: The roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 3, p. 886-903, mar. 1986.
- FORTUNE, J.E.; QUIRK, S.M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, suplement. 2, p. 1-8, 1988.
- GARDEREN, E.V.; SCHALKEN, J.A. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 153-165, nov. 2002.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas Colorido de Histologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 452p.
- GEOFFREY, H.A. **Reprodução e obstetrícia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979, 573p.
- GETTY, R.; GROSMANN, S. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 1485 p., 3 v.

GUSTAFSSON, J. A. Therapeutic potential of selective estrogen receptor Modulators. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 508-511, 1998.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. *In: \_\_\_\_\_*. **Reproduction in farm animal**. 7th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 2000. p.68-143.

HAMILTON, J.M.; ELSE, R.W.; FORSHAW. P. Oestrogen receptors in canine mammary tumours. **Veterinary Research**, v. 101, p. 258-260, 1977.

HATOYA, S. et al. Expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. **Neuroscience Letters**, v. 347, n. 2, p. 13 -135, aug. 2003.

HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 905-931, jul. 2007.

HELMÉN, E. et al. Prognostic factors in canine mammary tumours: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v. 30, n. 1, p. 20-27, jan. 1993.

HSUEH, A. J.W. et al. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 95-100, may 2000.

IWAI, T. et al. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. **Virchows Archiv. A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 417, n. 5, p. 369-375, 1990.

JERRY, D.J.; DUNPHY, K.A.; HAGEN, M.J. Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: a balancing act. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 1017-1023, 2010.

JIANG, J.Y. et al. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 222-237, jan. 2003.

JOHNSTON, S.D. Reproductive systems. *In: SLATTER, D. (Ed). Textbook of Small Animal Surgery*. 2 th. ed. Philadelphia: Sanders, p.177-2199, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Feminino. *In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica: Texto e Atlas*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 540p.

KELSEY, T. et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) allows the automatic identification of follicles in microscopic images of human ovarian tissue. **Pathology and Laboratory Medicine International**, v. 2, p. 99-105, aug. 2010.

KHAN-DAWOOD, F.S.; YUSOFF DAWOOD, M.; TABIBZADEH, S. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 3, p. 734-742, mar. 1996.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Órgãos genitais feminino. *In: \_\_\_\_\_*. **Anatomia dos Animais Domésticos**. Texto e Atlas Colorido. Órgãos e Sistemas. Porto Alegre: Artmed, 2004. v. 2, p.135-151.

- KIM, I.; GREENWALD, G.S. Effects of estrogens on follicular development and ovarian and uterine estrogen receptors in the immature rabbit, guinea-pig and mouse. **Endocrinologia Japonica**, v. 34, n. 6, p. 871-878, dec. 1987a.
- KIM, I.; GREENWALD, G.S. Estrogen receptors in ovary and uterus of immature hamster and rat: effects of estrogen. **Endocrinologia Japonica**, v. 34, n. 1, p. 45-53, feb. 1987b.
- LEWIS-WAMBI, J.S.; JORDAN, V.C. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1-12, may 2009.
- MAcEWEN, E.G. et al. Estrogen receptors in canine mammary tumours. **Cancer Research**, v. 42, p. 2255-2259, 1982.
- MARTIN DE LAS MULAS, J. et al. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 3, p. 269-272, may 2004.
- McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, apr. 1999.
- McCORMICK, D.; HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, v. 21, n. 6, p. 591-594, dec. 1992.
- McDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. 571p.
- McGEE, E.A.; HSUEH, A.J.W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 2, n. 2, p. 200-214, apr. 2000.
- MISDORP, W.; HART, A.A.M. Prognostic factors in canine mammary cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 4, p. 779-786, apr. 1976.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. *In*: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**, 4th ed., Ames: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.
- MOL, J.A. et al. Mammary growth hormone and tumorigenesis-lessons from the dog. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 111-115, oct. 1999.
- MONSON, K.R.; MALBICA, J.O.; HUBBEN, J.H. Determination of estrogen receptors in canine mammary tumours. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 1937-1939, 1977.
- MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; O'FARRELL, E. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**, v. 142, p. 656-658, 1998.
- MORRIS, J.G.; ROGERS, Q.R. Nutrition of healthy dogs and cats in various stages of adult life. *In*: ETTINGER, S.J.; FELDEMAN, E.C. **Text book of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat**. 5th. ed., Philadelphia: Saunders, p. 70-72, 2000.

- MORRISSON, W.B. Canine and feline mammary tumors. *In*: Morriison W.B. (ed). **Cancer in dogs and cats – medical and surgical management**. Baltimore:Williams& Wilkins, p. 591-598, 1998.
- NEVILLE, M. C.; McFADDEN, T. B.; FORSYT, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 1, p.49-66, jan. 2002.
- NICHOLSON, R.I. et al. Hormone sensitivity in breast cancer: Influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 27, n. 7, p. 908-913, jul. 1991.
- NISHIYAMA, T. et al. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 28, n. 2, p. 125-129, apr. 1999.
- ODORE, R. et al. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 4, p. 297-304, apr. 1999.
- OYAMA, T. et al. Proliferating cell nuclear antigen may be superior to argyrophilic nucleolar organizer regions in predicting shortened survival of patients with non-small cell lung cancer. **Surgical Oncology**, v. 4, n. 2, p. 83-89, 1995.
- OWEN, L.N. A comparative study of canine and human breast cancer. **Investigation in Cell Pathology**, v. 2, n. 4, p. 257-275, oct-dec. 1979.
- PEREZ-ALENZA, M.D. et al. Factors influencing the incidence and the prognosis of canine mammary tumours. **Journal Small Animal Practice**, v. 41, n. 7, p. 287-291, jul. 2000.
- PEREZ-MARTINEZ, C. et al. Expression of cytokeratins and vimentin in normal and neoplastic tissue from the bovine female reproductive tract. **Journal of Comparative Pathology**, v. 124, p. 70-78, jan. 2001.
- POPESKO, P. **Atlas of topographical anatomy of the domestic animals**. 2th ed. [S.l.]:W.B. Saunders Company, 1997. 3 v.
- PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. *In*: DELLMANN, H.D.S., EURREL, J **Textbook of Veterinary Histology**, 5th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1998, p. 247-269.
- RICHARDS, J.S. Hormonal control of genes expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 725-751, dec. 1994.
- RUSSO, I.H.; RUSSO, J. Primary prevention of breast cancer by hormone-induced differentiation. **Recent Results Cancer Research**, v. 174, p. 111-130, 2007.
- RUTTEMAN, G.R.; MISDORP, W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, supp., p. 483-487, 1993.
- RUTTEMAN, G.R. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. **In Vivo**, v. 4, n. 1, p. 33-40, jan-feb. 1990.

RUTTEMAN, G.R. et al. Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor prolife in non-malignant and malignant states. **British Journal of Cancer**, v. 58, p. 594-599, nov. 1988.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249-1261, dec. 1969.

SCHENEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v. 26, n. 26, p. 419-426, aug. 1970.

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 1, p. 113-119, sep. 2005.

TSAI, K. L.; CLARK, L.A.; MURPHY, K.E. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 6-7, p. 444-451, jul. 2007.

TUCKER, H. A. Hormones, mammary growth, and lactation: A 41- year perspective. **Journal of Dairy Science**.v. 83, n.4, p.874-884, apr. 2000.

van den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, apr. 2005.

van WEZEL, I. L. et al. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2602-2612, jun. 1999.

van WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biology of Reproduction** , v. 55, n. 5, p. 1003-1011, nov. 1996.

van ZWIETEN, M.J. General discussion, including brief review of animal models in breast cancer research: the dog. *In*: \_\_\_\_\_. **The Rat as an Animal Model in Breast Cancer Research**, Boston: Martinus Nijhffo Publishers, 1984. p. 215-217.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunolocalization of androgen receptors in the ovary canine and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 711-721, nov. 2001a.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunolocalization of progesterone receptors in the ovary canine and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 73-93, jul. 2001b.

VESANEN, M. Bovine uterine, cervical and ovarian cytosol estrogen and progesterone receptor concentrations in cystic ovarian disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, n. 1, p. 35-43, 1993.

VESANEN, M. et al. Bovine uterine, cervical and ovarian estrogen and progesterone receptor concentrations. **Animal Reproduction Sciences**, v. 26, n. 1-2, p. 61-71, nov. 1991.

YOSHIDA, M. et al. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. **The Journal of Toxicology Sciences**, v. 34, supp.1, p. 89-97, mar. 2009.

WEIHUA, Z. et al. Update on estrogen signaling. **FEBS Letterst**, v. 546, n. 1, p. 17-24, jul. 2003.

ZUCCARI, D.A.P.C. et al. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 23-28, mar. 2004.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a morfologia, o índice de proliferação e a densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a morfologia do tecido ovariano com as colorações histoquímicas de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson e pelo método de imunistoquímico com anticorpo anti-PCNA;
- Analisar a morfologia das células que compõem o estroma ovariano de cadela com e sem neoplasia mamária;
- Comparar o índice de proliferação das células do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária, utilizando método imunistoquímico com anticorpo anti-PCNA;
- Avaliar a densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária.

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA, DA PROLIFERAÇÃO E DA DENSIDADE CELULAR DO ESTROMA OVARIANO DE CADELAS COM E SEM NEOPLASIA MAMÁRIA.

**RESUMO:** A espécie canina é considerada um excelente modelo experimental para estudos na área da genética e fisiologia de mamíferos. A similaridade morfológica e molecular entre as neoplasias mamárias de cadelas e mulheres possibilita estudos da ação dos hormônios ovarianos na carcinogênese mamária e ovariana. O objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia, a proliferação e a densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária. Foram utilizados blocos histológicos de 40 ovários de cadelas com neoplasia mamária e 18 blocos de ovários de cadelas híidas. A morfologia foi analisada nas colorações histoquímicas de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson, e pelo método imunoistoquímico PCNA. A proliferação e a densidade das células estromais foi avaliada pelo método imunoistoquímico anti-PCNA. As cadelas com neoplasia mamária foram divididas em grupos por idade e por porte físico. Observou-se que o método imunoistoquímico PCNA permitiu uma melhor análise das características histológicas do estroma ovariano quando comparado com as colorações histoquímicas de rotina. O estroma ovariano é composto principalmente por células fusiformes e epitelióides em proporções semelhantes. Constatou-se que a proliferação e a densidade celular do estroma ovariano não sofrem alterações em cadelas com e sem neoplasia mamária ou em decorrência ao porte físico do animal. Verificou-se aumento significativo na densidade celular do estroma das cadelas com tumor mamário com idade entre 4 a 12 anos em relação às cadelas com 13 a 15 anos. Neste estudo, observou-se que nos ovários dentro dos limites de normalidade não há influência e alteração das células estromais ovariana na carcinogênese mamária.

**Palavras Chaves:** Ovário. PCNA. Estroma ovariano. Células intersticiais. Densidade estromal.

**ABSTRACT:** The canine species is considered an excellent experimental model for studies in genetics and physiology of mammals. The morphological and molecular similarities between the mammary neoplasms in bitches and women permit studies of the action of ovarian hormones on breast and ovarian carcinogenesis. The objective of this study was to evaluate the morphology, proliferation and cell density of ovarian stroma of dogs with and without breast cancer. Ovarian histological blocks of 40 bitches with breast cancer and 18 blocks from the ovaries of healthy dogs were used. The morphology was analyzed in histochemical staining of hematoxylin-eosin and Masson's trichrome, and immunohistochemistry with anti-PCNA. The proliferation and density of stromal cells was assessed by anti-PCNA immunohistochemistry. Bitches with mammary neoplasm were divided into groups by age and physique. It was observed that PCNA immunohistochemistry allowed a better analysis of the histological characteristics of the ovarian stroma when compared with routine histochemical stains. The ovarian stroma is mainly composed of spindle cells and epithelioid cells in similar proportions. It was found that the proliferation and cell density of ovarian stroma remain unchanged in bitch with and without mammary neoplasm or due to the physical size of the animal. There was significant increase in stromal cell density of bitches with mammary tumor with aged of 4-12 years compared to bitches with 13 to 15 years. In this study, we observed that the ovaries within normal limits and there is no influence change in ovarian stromal cells in mammary carcinogenesis.

**Keywords:** Ovary. PCNA. Ovarian stroma. Interstitial cells. Stromal density.

### 3.1.1 Introdução

A espécie canina é considerada um excelente modelo para o estudo de doenças genéticas e da carcinogênese em humanos (TSAI; CLARK; MURPHY, 2007; PAOLONI; KHANNA, 2008). Estudos em cadelas são utilizados para esclarecer a carcinogênese mamária devido às similaridades morfológicas e moleculares dos neoplasmas entre as duas espécies (PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000; LEE et al., 2004).

As mudanças morfológicas dinâmicas da glândula mamária da cadela ocorrem simultaneamente ao estágio do ciclo ovariano (GARDEREN; SCHALKEN, 2002), sendo que essas alterações são semelhantes em mulheres e cadelas (NELSON; KELLY, 1974; VOGEL et al., 1981;). Os hormônios ovarianos como progesterona e estrógeno possuem função primordial na fisiologia mamária, sendo essenciais para o desenvolvimento e crescimento do tecido mamário, assim como na carcinogênese do mesmo (NICHOLSON et al., 1991; MOL et al., 1999).

Estudos já demonstraram a expressão dos hormônios esteróides no tecido mamário normal e neoplásico de cadelas (DONNAY et al., 1993, 1995; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2004), assim como no ovário de diversas espécies (KIM; GREENWALD, 1987a,b; VESANEN et al., 1991; VESANEN, 1993; ODORE et al., 1999).

Segundo Harris et al. (1992), nas mulheres o início adiantado da menarca e o retardo da menopausa são associados ao aumento do risco do desenvolvimento de câncer de mama. Acredita-se que este aumento resulta da exposição consecutiva do tecido mamário aos hormônios estrogênicos produzidos pelos ovários, devido ao período longo de viabilidade reprodutiva.

É recente o interesse de pesquisadores da área da carcinogênese, principalmente mamária, pela interação estroma-epitélio dos tecidos neoplásicos. Sabe-se que as células estromais agem de forma parácrina contribuindo sinergicamente com a progressão e invasão da neoplasia (QUIROS et al., 2008; HUANG et al., 2010; MALLER et al., 2010; OLSEN et al., 2010; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010). Essa interação estroma-epitélio já ocorre fisiologicamente no tecido ovariano, podendo assim contribuir nos estudos.

Os mecanismos da ação dos hormônios estrogênicos na contribuição do desenvolvimento de câncer mamário em cadelas já são definidos (MISDORP, 1988, RUTTEMAN, 1990; RUTTEMAN; MISDORP, 1993). Devido às características da fase lútea do ciclo ovariano na cadela possuir um período prolongado, esta espécie tem se tornado

um modelo adequado nos estudos da ação dos hormônios ovarianos na fisiologia e carcinogênese mamária (GARDEREN; SCHALKEN, 2002).

A maior parte das pesquisas envolvendo o tecido mamário e ovariano utiliza-se de biomarcadores de proliferação celular e hormonal. No entanto, o estudo da morfologia mamária e ovariana, como medida descritiva para análise, também é de grande valia no controle de alterações pré-neoplásicas (TING et al., 2007).

Estudos que abordam as interações entre esteróides e as células do estroma ovariano são de suma importância para o esclarecimento da carcinogênese mamária (HORIE et al., 1992), uma vez que as células estromais são responsáveis pela síntese de andrógenos, os quais serão biotransformados em estrógenos (RICHARDS, 1994; FELDMANN e NELSON, 1997; van den HURK; ZHAO, 2005).

Pouco se conhece sobre o estroma ovariano, principalmente de mulheres, devido à falta de sistemas experimentais (QUIROS et al., 2008). Apesar do conhecimento de que as células estromais do ovário possuem funções essenciais na regulação e/ou facilitação do processo de ovulação (KHAN-DAWOOD; DAWOOD; TABIBZADEH, 1996), na ação sobre as células do estroma mamário (WOODWARD et al., 2001) e na carcinogênese mamária e ovariana (TING et al., 2007). Deste modo, o objetivo do presente estudo foi analisar a morfologia ovariana, a proliferação e a densidade celular do estroma ovariano de cadelas com e sem neoplasia mamária.

### 3.1.2 Material e Métodos

#### 3.1.2.1 Amostras

Foram utilizados neste estudo blocos histológicos de ovários, de 40 cadelas com neoplasia mamária submetidas ao procedimento cirúrgico terapêutico (mastectomia e ovariosalpingohisterectomia) e de 18 cadelas híginas submetidas à ovariosalpingohisterectomia eletiva. Foi analisado um ovário de cada animal, sendo a escolha do ovário aleatória.

As pacientes oncológicas são provenientes do setor de Teriogenologia de Animais de Companhia, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV – UEL), Londrina-PR, Brasil. As cadelas sem neoplasia eram do Biotério da Universidade Regional de Blumenau, Blumenau-SC, Brasil.

Os dados clínicos das pacientes oncológicas foram coletados do prontuário do Hospital Veterinário e da ficha de solicitação do exame histopatológico encaminhada ao Laboratório de Patologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil

As pacientes oncológicas foram divididas em grupos distintos baseados em:

- Idade do animal: de 4 a 7 anos (G1), de 8 a 12 anos (G2), de 13 a 15 anos (G3);
- Porte físico: O porte foi estabelecido pelo peso corpóreo, sendo considerados de porte pequeno cães com peso  $\leq 10$  kg (GP), porte médio  $> 10$  e  $\leq 20$  kg (GM), porte grande/gigante  $> 20$  kg (GG).
- Tipo de neoplasia: conforme a classificação histológica da neoplasia mamária pelo sistema *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat* (MISDORP et al., 1999).

Todas as cadelas sem neoplasia eram de porte médio, possuía peso  $> 10$  e  $\leq 20$  kg, sendo todas submetidas ao mesmo manejo sanitário e alimentar.

### 3.1.2.2 Processamento histopatológico e imunoistoquímico

Os ovários foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada. Após a fixação, as amostras foram submetidas ao processamento histológico que consistiu na desidratação em série crescente de alcoóis, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram corados pelo método de Hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson (Masson) para avaliação das alterações histológicas.

Para avaliação da proliferação e da densidade das células estromais utilizou-se o exame imunoistoquímico com anticorpo anti-PCNA (PC10, Zymed®). Os cortes histológicos em lâminas previamente silanizadas foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica por meio de calor (panela de pressão) por 15 min. em solução de citrato de sódio 10 mM/pH 6,0. Em seguida realizou-se bloqueio da peroxidase endógena, com imersão das lâminas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 5% por 30 min. e ao abrigo da luz. Seguiu-se a incubação dos cortes, em câmara úmida em temperatura de 4° C por 18 horas, com o anticorpo primário anti-PCNA (PC10, Zymed®), na diluição de 1:800, diluídos em solução de PBS. As lâminas foram então imersas em uma solução com PBS e leite em pó (Molico®) por 10 min. e em seguida feita a incubação com o amplificador (HiDef Detection® HRP System, Cell Marque) por 15 min., em temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário

(HiDefDetection® HRP System, Cell Marque) por 15 min. a temperatura ambiente, seguida de revelação por solução de cromógeno DAB (HiDef Detection® HRP System, Cell Marque) por 4 min. em câmara escura. Concluída a imunocoloração, as lâminas foram imersas em água destilada e submetidas à contra- coloração com hematoxilina de Gill por 10 min., seguida de imersão em solução de Scott por 1 min., desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, variando de 50% a 90%, sendo, finalmente, imersos em xilol (10 min., 2x) e montados com lamínula e resina comercial. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações segundo a recomendação do fabricante.

### 3.1.2.3 Análise morfológica

A análise da morfologia do ovário foi realizada em todo corte histológico, nas colorações histoquímicas de Hematoxilina-eosina e Tricrômicode Masson, e na reação de imunoistoquímica com anticorpo anti-PCNA.

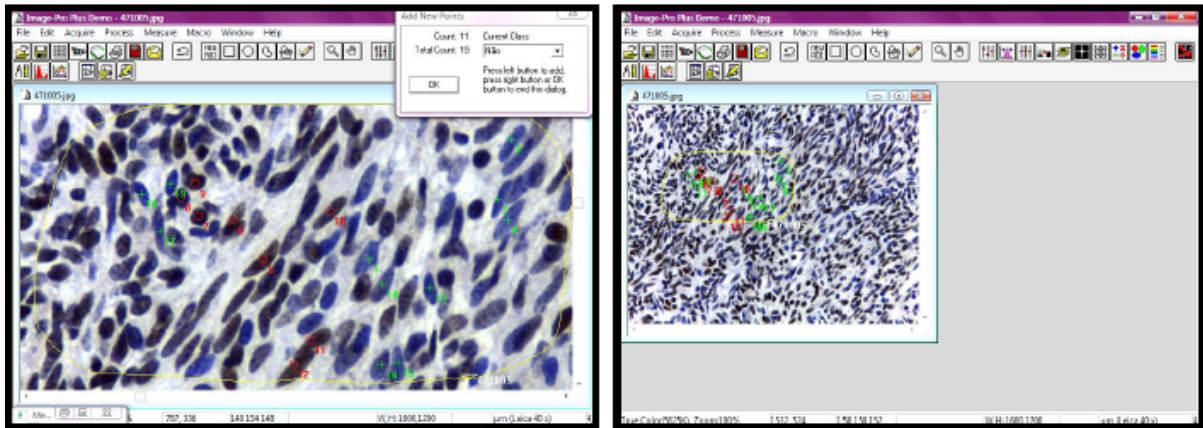
Para a avaliação da proliferação e da densidade celular do estroma ovariano foi utilizado o método de imunoistoquímica PCNA, através da análise de imagens digitalizadas. A análise foi realizada na região do estroma ovariano adjacente aos folículos terciários. A classificação do folículo terciário foi baseada em SONGSASEN e WILDT (2005).

Para a digitalização das imagens utilizou-se um microscópio com câmera digital e sistema de captura de imagens Leica ICC 50® 3.1 Mpixel USB 2.0.

Em cada amostra foram selecionados cinco campos do estroma, próximos aos folículos terciários, utilizando a objetiva de 40x. Esses campos foram digitalizados. A área estromal, selecionada e digitalizada, foi demarcada e mensurada com auxílio do programa Imagem Pró Plus 4.0 *Media Cybernetics* (Figura 1).

Todas as células do estroma (reagentes e não reagentes ao anticorpo anti-PCNA) da área demarcada foram selecionadas manualmente para contagem (Figura 1). A densidade celular do estroma foi obtida através da contagem das células na área demarcada. Para a avaliação dos tipos de células que compõem o estroma foi estabelecida uma graduação semi-quantitativa. A imagem digitalizada foi dividida em quatro quadrantes e em cada quadrante as células epitelióides e fusiformes foram quantificadas em percentual (25%, 50% e 75%).

**Figura 1** – Imagens digitalizadas para análise com auxílio do programa Imagem Pró Plus 4.0. A imagem à esquerda demonstra a contagem manual das células. As células reativas para o anticorpo anti-PCNA foram marcadas com círculo vermelho e células não reativas com uma cruz verde. A imagem à direita demonstra a área demarcada para análise (círculo amarelo) da imagem digitalizada na objetiva de 40x. Londrina, 2011.



### 3.1.2.4 Análise estatística

Para comparar os índices de proliferação e a densidade celular do estroma ovariano nos animais com neoplasia e sem neoplasia mamária foi utilizado o Teste t de Student para amostras independentes. Na análise dos índices de proliferação e de densidade celular nos diferentes grupos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *One Way* seguido do post-hoc de Duncan. Considerou-se um nível de significância quando  $p \leq 0,05$ .

### 3.1.3 Resultados

Os animais utilizados neste estudo possuíam idade entre 4 a 15 anos, com mediana de  $9 \pm 3$  anos. As pacientes sem neoplasia mamária eram adultas e foram submetidas ao mesmo manejo nutricional e sanitário por período não inferior a 4 anos.

As pacientes oncológicas apresentavam um ou dois tipos de neoplasias mamárias. Os dados referentes à classificação das neoplasias associadas à idade e porte físico estão dispostos nas Tabela 1 e 2, respectivamente. As neoplasias malignas foram mais freqüentes, apresentando a seguinte distribuição: carcinoma complexo (18/45%), carcinoma simples (10/25%), carcinoma complexo e carcinoma simples (4/10%), carcinoma complexo e adenoma complexo (2/5%), carcinoma *in situ* (2/5%), carcinoma simples e tumor misto

benigno (1/2,5%), carcinoma simples e adenoma simples (1/2,5%), carcinosarcoma (1/2,5%), sarcoma mamário (1/2,5%).

**Tabela 1** – Distribuição das neoplasias, quanto ao tipo histológico, nos grupos por idade. Londrina, 2011.

Tipo histológico *	Grupos por idade		
	G1	G2	G3
	(4-7 anos)	(8-12 anos)	(13-15 anos)
Carcinoma complexo	6 (33,33%)	11 (64,70%)	1 (20 %)
Carcinoma simples	4 (22,22%)	4 (23,54 %)	2 (40 %)
Carcinoma <i>in situ</i>	2 (11,11%)	-	-
Carcinoma complexo e adenoma complexo	1 (5,56 %)	1 (5,88 %)	1 (20 %)
Carcinoma complexo e carcinoma simples	4 (22,22%)	-	-
Carcinoma simples e tumor misto benigno	-	1 (5,88%)	-
Carcinoma simples e adenoma simples	-	-	-
Carcinosarcoma	1 (5,56%)	-	-
Sarcoma	-	-	1 (20 %)
Total	18 (100 %)	17 (100 %)	5 (100 %)

\* Sistema *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat* (MISDORP et al., 1999).

**Tabela 2** – Distribuição das neoplasias, quanto ao tipo histológico, nos grupos por porte físico. Londrina, 2011.

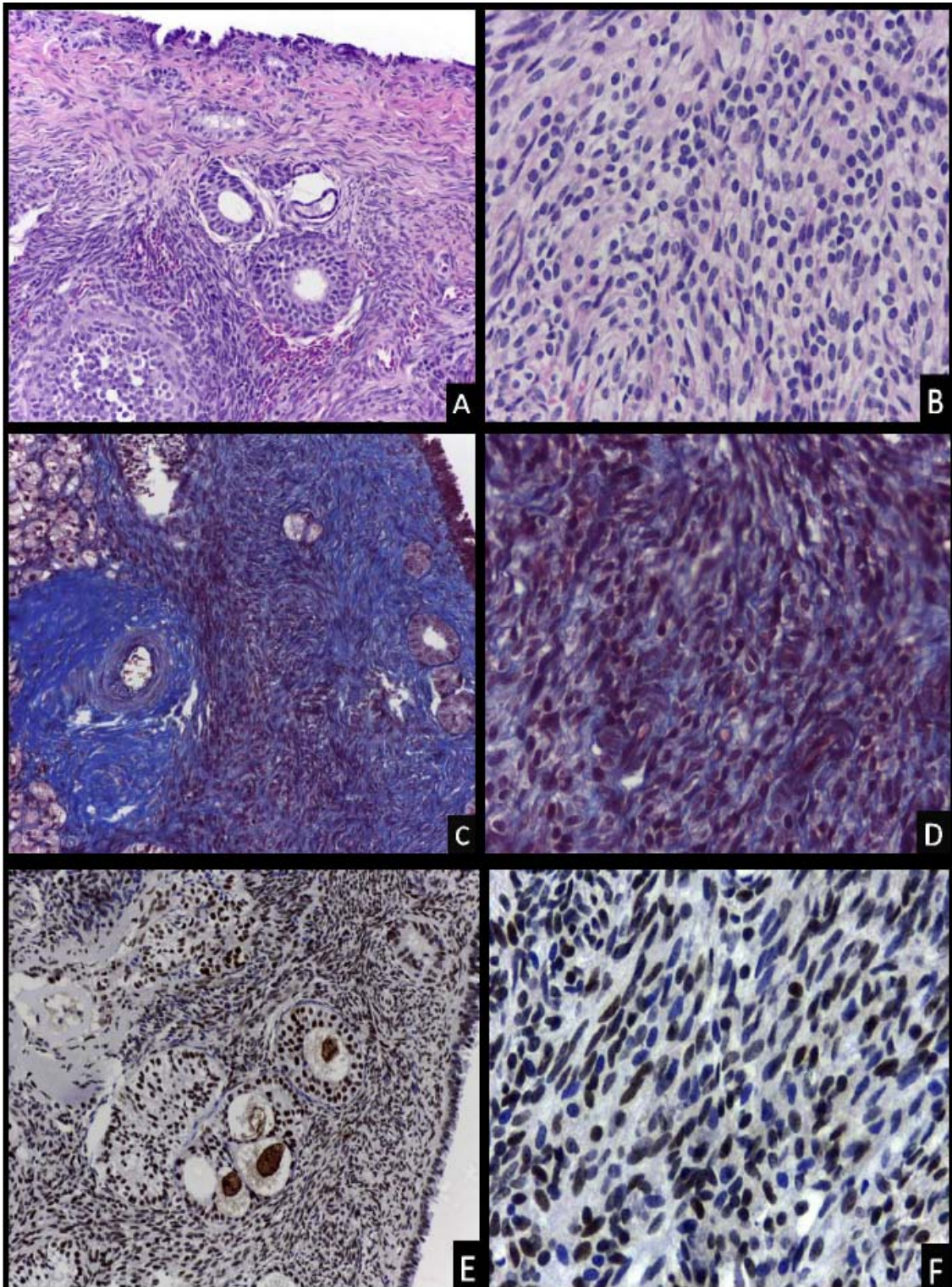
Tipo histológico *	Grupos por porte físico		
	GP (≤ 10 kg)	GM (>10 a ≤ 20 kg)	GG (>20 kg)
Carcinoma complexo	6 (40 %)	8 (50 %)	4 (44,45 %)
Carcinoma simples	2 (13,33 %)	5 (31,25 %)	3 (33,33 %)
Carcinoma <i>in situ</i>	-	1 (6,25 %)	1 (11,11 %)
Carcinoma complexo e adenoma complexo	2 (13,33 %)	-	-
Carcinoma complexo e carcinoma simples	2 (13,33 %)	2 (12,50 %)	-
Carcinoma simples e tumor misto benigno	1 (6,67 %)	-	-
Carcinoma simples e adenoma simples	1 (6,67 %)	-	-
Carcinossarcoma	-	-	1 (11,11 %)
Sarcoma	1 (6,67 %)	-	-
Total	15 (100 %)	16 (100%)	9 (100%)

\* Sistema *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat* (MISDORP et al., 1999).

Os cortes histológicos dos ovários foram analisados nas colorações histológicas de Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson e no método imunoistoquímico com anticorpo anti-PCNA. Não foram observadas alterações histológicas significativas nos ovários analisados dos grupos com neoplasias e sem neoplasia.

A coloração de HE é utilizada na rotina na análise morfológica de ovário (Figura 2A, 2B). Constatou-se no presente estudo, que o método imunoistoquímico PCNA facilita a observação das células do estroma, sua disposição, principalmente nas áreas de estroma mais denso (Figura 3C). Na análise com a coloração de Tricrômico de Masson não foi possível observar com nitidez as células do estroma, principalmente os núcleos, uma vez que eles parecem estar sobrepostos (Figura 2C, 2D).

**Figura 2** – Fotomicrografias do ovário canino. Figuras A, C e E) Análise das estruturas ovarianas (epitélio superficial, folículos e estroma) pelas colorações histoquímicas de HE (A) e Tricrômico de Masson (C) e pelo método imunohistoquímico com anticorpo anti-PCNA (E). Objetiva de 20x. Figuras B, D e F) Análise das células fusiformes (núcleos alongados) e epitelióides (núcleos arredondados) que compõem o estroma ovariano, pelas colorações de HE (B), Masson (D) e reação imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA (F). Objetiva de 40x. Londrina, 2011.

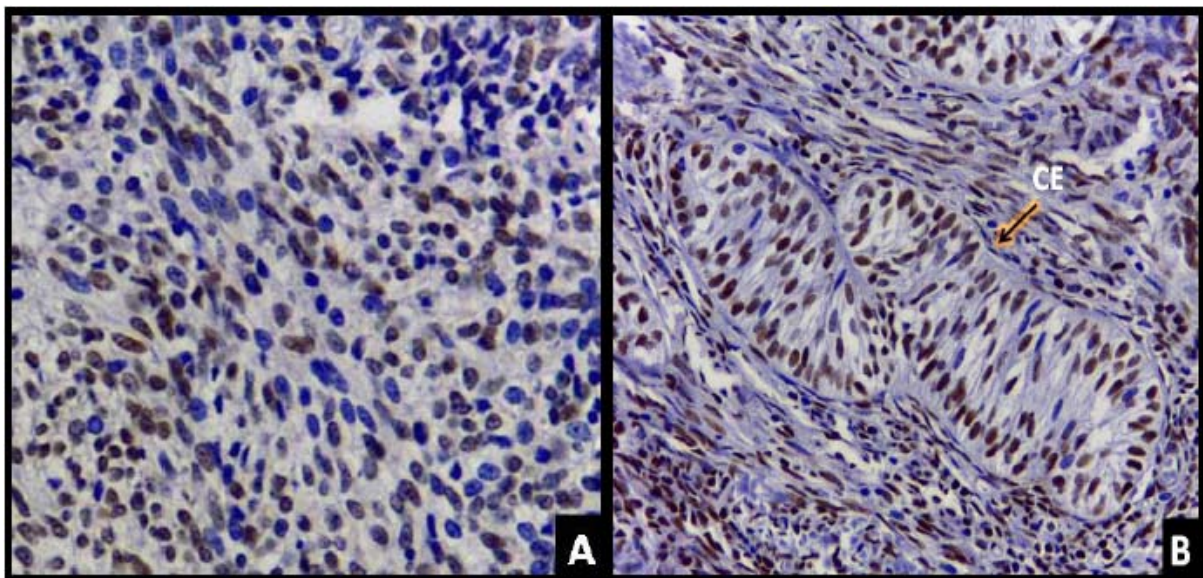


Na análise dos cortes histológicos, pela reação imunoistoquímica PCNA, observou-se que o estroma ovariano é composto predominantemente por células fusiformes e epitelióides. Estas células estão distribuídas na região cortical do ovário de permeio aos folículos.

As células fusiformes possuem núcleo alongado e compõem um estroma mais denso ao redor de folículos primordiais e primários, predominando nestas áreas. Esse tipo celular também é observado ao redor e próximo aos folículos secundários e terciários (Figura 2F, 2E), compondo as camadas da teca (teca interna e externa) ou estando intercaladas às células intersticiais (epitelióides).

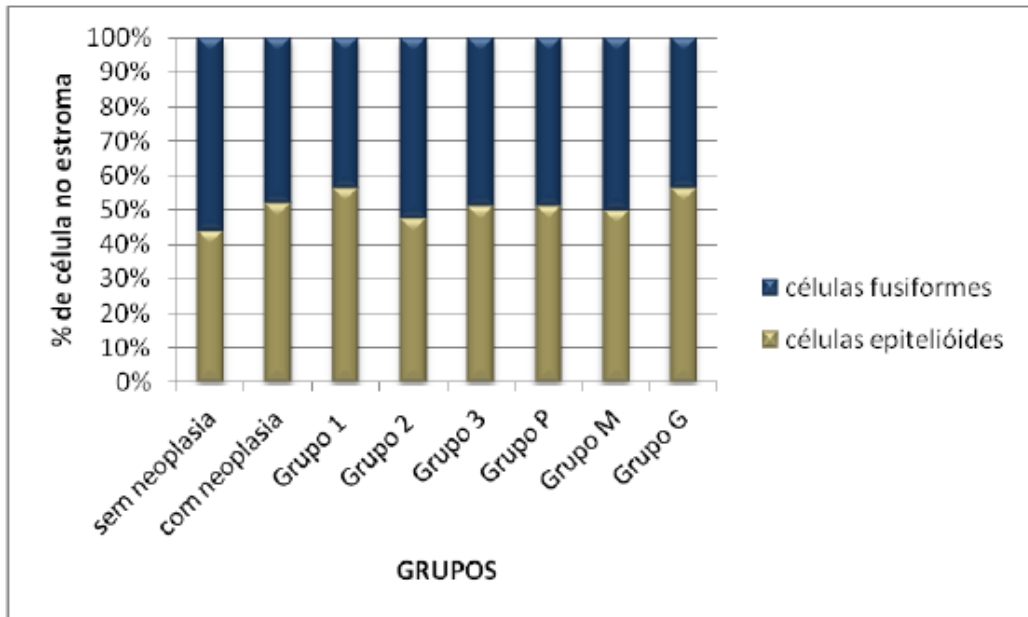
As células intersticiais são pequenas, epitelióides, com citoplasma indistinto e com núcleo redondo (Figura 3A). Outro tipo celular que foi observado no estroma de cadelas são as células endócrinas; Tais células são poliédricas e formam arranjos em cordões ou paliçadas. Esses arranjos distribuem-se irregularmente pela região cortical dos ovários (Figura 3B).

**Figura 3**– Fotomicrografias do estroma ovariano canino. A) Estroma com predomínio de células epitelióides, com núcleo redondo. B) Células endócrinas (CE) formando arranjos em cordões ou paliçadas (seta). PCNA. Objetiva de 40x. Londrina, 2011.



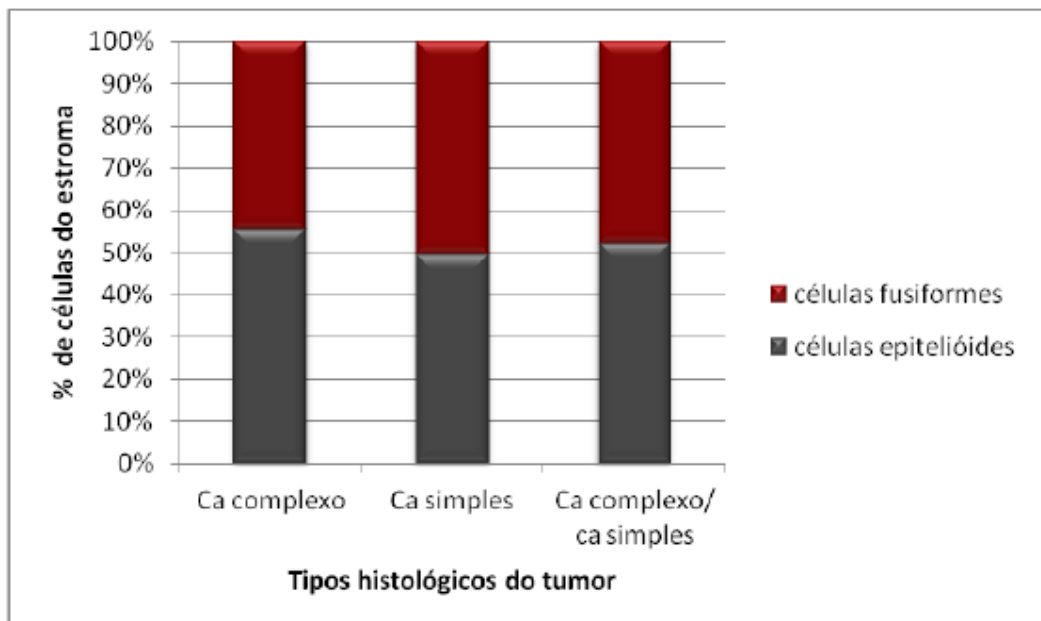
Na análise semi-quantitativa realizada nas imagens do estroma adjacente aos folículos terciários, observou-se a distribuição de forma semelhante das células fusiformes e epitelióides na maioria dos grupos analisados. Os resultados estão dispostos na Figura 4.

**Figura 4** – Porcentagem das células fusiformes e epitelióides que compõem o estroma ovariano das cadelas sem e com neoplasia mamária e nas cadelas distribuídas nos grupos por idade e por porte físico. Londrina, 2011.



Nos ovários das cadelas com neoplasia mamária com os tipos histológicos de carcinoma complexo, carcinoma simples e carcinoma complexo/carcinoma simples (dois tipos histológicos na mesma paciente), não se observou o predomínio de um dos tipos celulares do estroma (Figura 5).

**Figura 5** – Porcentagem das células fusiformes e epitelióides que compõem o estroma ovariano das cadelas distribuídas aos tipos histológicos de carcinoma complexo, carcinoma simples e carcinoma complexo/carcinoma simples. Londrina, 2011.



Para avaliar a proliferação e a densidade celular do estroma ovariano utilizou-se a marcação pelo método imunoistoquímico com o anticorpo anti-PCNA. Foram avaliados cinco campos na objetiva de 40x, sendo demarcada em cada campo uma área média de  $9.442,78 \pm 717,65 \mu\text{m}^2$  (Figura 1 e 2), representando aproximadamente 12% do campo de 40x, com a área total analisada por ovário de  $47.213,91 \pm 2.433,61 \mu\text{m}^2$ , para obtenção da densidade celular.

Nas áreas demarcadas foram contadas as células reativas e não reativas para o anticorpo anti-PCNA (Figura 1 e 2), sendo que a soma delas resulta na densidade celular do campo. Não foi observada diferença estatística significativa no índice de proliferação celular (células imunorreativas) e na densidade celular do estroma ovariano entre os grupos com e sem neoplasia mamária, e nos grupos divididos por porte físico. Constatou-se que a densidade celular do estroma ovariano, próximo aos folículos terciários, nos grupos de cadelas com idade entre 4-7 anos (G1) e de 8-12 anos (G2) é significativamente maior em relação ao grupo de cadelas com idade entre 13-15 anos (G3). Essa diferença significativa é decorrente do aumento observado no número de células não reagentes para a reação imunoistoquímica PCNA, nos grupos G1 e G2 quando comparados ao G3. Os resultados estão dispostos nas Tabela 3, 4, 5 e 6.

**Tabela 3** – Quantificação da proliferação e da densidade celular na área total analisada do estroma ovariano do grupo com e sem neoplasia mamária, utilizando método imunoistoquímico PCNA (valores de média  $\pm$  erro padrão). Londrina, 2011.

	Valores de média $\pm$ erro padrão	
	Com neoplasia	Sem neoplasia
Células PCNA + *	357,98 $\pm$ 41,48	462,39 $\pm$ 70,93
Células PCNA - #	651,03 $\pm$ 49,29	560,89 $\pm$ 64,14
Densidade celular	1009,00 $\pm$ 31,26	1023,28 $\pm$ 52,06

\* = células reativas para a reação imunoistoquímica com anticorpo anti-PCNA;

# = células não reativas para a reação imunoistoquímica com anticorpo anti-PCNA.

Distribuição *t* de Student, nível de significância quando  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 4** – Quantificação da proliferação e da densidade celular do estroma ovariano dos grupos por idade com neoplasia e do grupo sem mama, utilizando método imunistoquímico PCNA (valores de média  $\pm$  erro padrão). Londrina, 2011.

	Valores de média $\pm$ erro padrão			
	G1 (4-7 anos) <sup>£</sup>	G2 (8-12 anos) <sup>£</sup>	G3 (13-15 anos) <sup>£</sup>	Grupo sem neoplasia
Células PCNA + <sup>*</sup>	295,33 $\pm$ 64,25	381,71 $\pm$ 64,33	502,80 $\pm$ 74,39	462,39 $\pm$ 70,93
Células PCNA - <sup>#</sup>	714,44 $\pm$ 76,46 <sup>a</sup>	680,82 $\pm$ 72,21 <sup>a</sup>	321,40 $\pm$ 60,39 <sup>b</sup>	560,89 $\pm$ 64,14
Densidade celular <sup>π</sup>	1009,77 $\pm$ 65,59 <sup>c</sup>	1062,53 $\pm$ 56,05 <sup>c</sup>	824,20 $\pm$ 33,95 <sup>d</sup>	1023,28 $\pm$ 52,06

£ = grupo com neoplasia mamária;

\* = células reativas para a reação imunistoquímica com anticorpo anti-PCNA;

# = células não reativas para a reação imunistoquímica com anticorpo anti-PCNA;

Teste de análise de variância (ANOVA) *One Way* seguido do post-hoc de Duncan: letras diferentes na mesma linha, significância estatística com  $p \leq 0,05$ , sendo  $G1 \times G3(\#)$   $p = 0,007697$ ;  $G2 \times G3(\#)$   $p = 0,010856$ ;  $G1 \times G3(\pi)$   $p = 0,037523$ ;  $G2 \times G3(\pi)$   $p = 0,011629$ .

**Tabela 5** – Quantificação da proliferação e densidade celular do estroma ovariano dos grupos por porte físico com neoplasia mamária e do grupo sem neoplasia mamária, utilizando método imunistoquímico PCNA (valores de média  $\pm$  erro padrão). Londrina, 2011.

	Valores de média $\pm$ erro padrão			
	GP <sup>£</sup>	GM <sup>£</sup>	GG <sup>£</sup>	Grupo sem neoplasia
Células PCNA + <sup>*</sup>	343,73 $\pm$ 60,01	368,63 $\pm$ 73,22	362,78 $\pm$ 94,05	462,39 $\pm$ 70,93
Células PCNA - <sup>#</sup>	615,07 $\pm$ 93,73	684,31 $\pm$ 71,88	651,78 $\pm$ 96,30	560,89 $\pm$ 64,14
Densidade celular	958,80 $\pm$ 55,73	1052,90 $\pm$ 45,12	1014,60 $\pm$ 66,08	1023,28 $\pm$ 52,06

£ = grupo com neoplasia mamária;

\* = células reativas para a reação imunistoquímica com anticorpo anti-PCNA;

# = células não reativas para a reação imunistoquímica com anticorpo anti-PCNA.

Teste de análise de variância (ANOVA) *One Way* seguido do post-hoc de Duncan, nível de significância quando  $p \leq 0,05$ .

**Tabela 6** – Quantificação da proliferação e densidade celular do estroma ovariano dos tipos histológicos mais frequentes nas pacientes oncológicas, utilizando método imunohistoquímico de anti-PCNA (valores de média ± erro padrão). Londrina, 2011.

	Valores de média ± erro padrão		
	Carcinoma complexo (n= 18)	Carcinoma simples (n= 10)	Carcinoma complexo/carcinoma simples (n= 4)
Células PCNA + *	377,72 ± 69,17	452,50 ± 82,10	290,00 ± 72,75
Células PCNA - #	610,50 ± 65,79	534,10 ± 87,90	773,25 ± 86,39
Densidade celular	988,22 ± 43,10	986,60 ± 75,98	1063,25 ± 35,12

\* = células reativas para a reação imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA;

# = células não reativas para a reação imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA.

Teste de análise de variância (ANOVA) *One Way* seguido do post-hoc de Duncan, nível de significância quando  $p \leq 0,05$ .

#### 3.1.4 Discussão

As células do estroma ovariano são vitais no processo da foliculogênese (QUIROSet al., 2008), fornecendo células especializadas, como fibroblastos, que irão circundar o folículo ativado e contribuindo com a sustentação, e posteriormente formação das camadas da teca (ERICKSON et al.; 1985; ORISAKA et al., 2006; HONDA et al., 2007) e na síntese de produtos intermediários para a produção de estrógenos (FORTUNE; QUIRK, 1988; FELDMANN; NELSON, 1997).

A análise da morfológica dos ovários é realizada com o uso das colorações histoquímicas Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Masson (KHAN-DAWOOD; DAWOOD; TABIBZADEH, 1996). As células da granulosa e do estroma expressam imunorreatividade para o anticorpo anti-PCNA (KHAN-DAWOOD; DAWOOD; TABIBZADEH, 1996).

Neste estudo constatou-se que o método imunohistoquímico com anticorpo anti-PCNA permite, com maior nitidez, a caracterização e a observação da disposição das células do estroma ovariano principalmente nas áreas com maior densidade celular, quando comparada com as colorações histoquímicas de HE e Masson. O método imunohistoquímico PCNA na análise histológica de ovários é recente, e frequentemente utilizado na identificação e contagem de folículos, em pesquisas de várias espécies animais, entre elas a bovina e a

suína (MUSKHELISHVILI et al., 2002, MUSKHELISHVILI; WINGARD; LATENDRESSE, 2005; TOMÁNEK; CHRONOWSKA, 2006; PICUT et al., 2008).

Os grupos de cadelas com neoplasia mamária com idade entre 4 a 12 anos (G1 e G2) apresentaram um aumento significativo da densidade das células do estroma adjacente aos folículos terciários, em relação ao grupo de cadelas com neoplasia mamária com 13 a 15 anos (G3). Verificou-se que o aumento significativo do número de células não reagentes ao anticorpo anti-PCNA foi o fator que contribuiu para o aumento da densidade celular desta região.

Não se conhece claramente o mecanismo de formação das camadas da teca. Duas hipóteses são aventadas; a diferenciação das células já existentes ao redor dos folículos ativados ou o recrutamento e migração de células estromais (YOUNG; McNEILLY, 2010).

As células da teca são controladas pelo hormônio luteinizante (LH) produzido na hipófise (RICHARDS, 1994; MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; MCGEE; HSUEH, 2000; Van Den HURK; ZHAO, 2005). Após a proliferação e diferenciação, as células da teca passam a sintetizar andrógenos, os quais servirão de substrato para a produção de estrógenos pelas células da granulosa (FELDMANN; NELSON, 1997). Os estrógenos são essenciais para a função do sistema reprodutor feminino, por promoverem a hiperplasia e hipertrofia das células glandulares, mas também podem iniciar e promover a carcinogênese (MOL et al., 1999; HELDRING et al., 2007).

Nas cadelas sem e com neoplasia mamária, independente do porte físico e faixa etária, não foi observada alteração significativa no índice de proliferação celular na região do estroma próximo aos folículos terciários. Em mulheres, estudos prévios indicaram que as células hiperplásicas do estroma exibem um aumento na proliferação e resistência a apoptose, principalmente as células da teca interna e externa (SLUIJMER et al., 1998; JONGEN et al., 2003), tendo estas alterações um papel significativo na carcinogênese de órgãos reprodutores (WOODWARD et al., 2001; TING et al., 2007). Ainda, em mulheres, a hiperplasia do estroma ovariano foi associada à maior síntese de hormônios estrogênicos e ao desenvolvimento de ovários policísticos (SLUIJMER et al., 1998; JONGEN et al., 2003). Em cadelas, os ovários policísticos também são associados ao aumento de hormônio estrogênico (GRAFFARRI et al., 2009). A associação entre hormônios estrogênicos e o desenvolvimento de neoplasias mamárias está bem estabelecida na cadela (MISDORP, 1988; RUTTEMAN, 1990; RUTTEMAN; MISDORP, 1993).

Recentemente, estudos envolvendo células estromais, fibroblastos associados ao tumor (CAF) e sua possível associação na carcinogênese tem despertado

interesse. Os CAF segregam vários fatores que atuam de forma parácrina, agindo não somente em células neoplásicas, mas em outras células no estroma do tumor, promovendo muitas vezes o crescimento e a invasão da neoplasia (ORIMO et al., 2005; QUIROS et al., 2008; HUANG et al., 2010; RÄSÄNEN; VAHERI, 2010; POTTER et al., 2011).

Neste estudo observou-se que nos ovários histologicamente normais não há influência das células estromais ovariana na carcinogênese mamária, mas outros estudos futuros estudos são necessários para elucidar o papel de células estromais ovarianas em ovários com hiperplasia ou neoplasia, e sua influencia na carcinogênese mamária.

O ovário com o aspecto histológico dentro da normalidade no momento da ovariosalpingoisterectomia não corresponde necessariamente ao padrão histológico do mesmo ao que se exibia no momento da promoção do tumor mamário. Sendo o ovário um órgão dinâmico e os tumores mamários tornarem-se hormônio independente progressivamente de forma que o retorno do padrão histológico à normalidade ovariana não interfira com a progressão neoplásica.

#### REFERÊNCIAS

ANDERSEN, A. C.; SIMPSON, M. E. **The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle)** Los Altos: Geron-X, 1973, 290p.

AKIHARA, Y. et al. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 495-501, oct. 2007.

BARBER, M. R. et al. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. **Theriogenology**, v. 1, n. 8, p. 1705-1717, may 2001.

BEAUMONT, H.M.; MANDL, A.M. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. **Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 155, p. 557-579, apr. 1962.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 1549-1554, oct. 1987.

DOLEZÉL, R. et al. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, p. 37-43, feb. 2004.

DAMODARAN, S. et al. Ovarian stromal hyperplasia and hyperthecosis: an unusual case of post-menopausal hirsutism. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, may 2011.

- DONNAY, I. et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, sep. 1995.
- DONNAY, I. et al. Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 501-512, 1993.
- DURRANT, B.S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 917-932, apr. 1998.
- ERICKSON, G.F. et al. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. **Endocrine Reviews**, v. 6, n. 3, p. 371-399, 1985.
- FANTON, J.W.; WHITROW, S.J. Canine mammary neoplasia: an overview. **Califórnia Veterinarian**, v. 7, p. 12-16, 1981.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. The ovarian cycle & vaginal cytology in the bitch. *In*: DI BRYDEN. **Internal Medicine**. Sydney: The Post-Graduate Foundation in Veterinary Science of the University of Sydney, 1997. p. 273-288.
- FORTUNE, J.E.; QUIRK, S.M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v. 66, suplem. 2, p. 1-8, 1988.
- CASSALI, G.D. **Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- GARDEREN, E.V.; SCHALKEN, J.A. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1-2, p. 153-165, nov. 2002.
- GRAFFARRI, M. S. et al. Estrogen-related alopecia due to polycystic ovaries in a terrier dog. **Comparative Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 341-343, 2009.
- HALL, P.A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **The Journal of Pathology**, n. 164, n. 4, p. 285-294, dec. 1990.
- HARRIS, J.R. et al. Breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 319-328, 1992.
- HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 905-931, jul. 2007.
- HONDA, A. et al. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 12389-12394, apr. 2007.

- HORIE, K. et al. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. **Human Reproduction**, v. 7, p. 184-190, 1992.
- HUANG, M. et al. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of cd44, cd24-cells through sdf-1/cxcr4 interaction. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 22, p. 29-80, jun. 2010.
- JONGEN, V. H. et al. Ovarian stromal hyperplasia and ovarian vein steroid levels in relation to endometrioid endometrial cancer. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 110, n. 7, p. 690-605, jul. 2003.
- KHAN-DAWOOD, F. S.; DAWOOD, M. Y.; TABIBZADEH, S. Immunohistochemical analysis of de microanatomy of primate ovary. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 734- 742, 1996.
- KIM, I.; GREENWALD, G.S. Effects of estrogens on follicular development and ovarian and uterine estrogen receptors in the immature rabbit, guinea-pig and mouse. **Endocrinologia Japonica**, v. 34, n. 6, p. 871-878, dec. 1987a.
- KIM, I.; GREENWALD, G.S. Estrogen receptors in ovary and uterus of immature hamster and rat: effects of estrogen. **Endocrinologia Japonica**, v. 34, n. 1, p. 45-53, feb. 1987b.
- LEE, C.H. et al. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal Veterinary Sciences**. v. 5, n. 1, p. 63-69, mar. 2004.
- MALLER, O.; MARTINSON, H.; SCHEDIN, P. Extracellular matrix composition reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 301-318, sep. 2010.
- MARTIN DE LAS MULAS, J. et al. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 3, p. 269-272, may 2004.
- McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, apr. 1999.
- McGEE, E.A.; HSUEH, A.J.W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 2, n. 2, p. 200-214, apr. 2000.
- MISDORP, W. et al. **Histological Classification of the Mammary Tumors of the Dog and the Cat.** In: WORLD Health Organization International Histological of Tumors of Domestic Animals. 2th ed., Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1999.
- MISDORP, W. Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. **The Veterinary Quarterly**. v. 10, n. 1, p. 26-33, jan. 1988.
- MOL, J.A. et al. Mammary growth hormone and tumorigenesis-lessons from the dog. **Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 111-115, oct. 1999.

MUSKHELISHVILI, L. et al. An immunohistochemical label to facilitate counting of ovarian follicles. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 3, p. 400-4002, may-jun. 2002.

MUSKHELISHVILI, L.; WINGARD, S.K.; LATENDRESSE, J.R. Proliferating cell nuclear antigen- a marker for ovarian follicle counts. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 3, p. 365-368, 2005.

NELSON, L.W.; KELLY, W.A. Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 113-122, jan. 1974.

NICHOLSON, R.I. et al. Hormone sensitivity in breast cancer: Influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 27, n. 7, p. 908-913, jul. 1991.

ODORE, R. et al. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 4, p. 297-304, apr. 1999.

OLSEN, C.J. et al. Human mammary fibroblasts stimulate invasion of breast cancer cells in a three-dimensional culture and increase stroma development in mouse xenografts. **BMC Cancer**, v. 19, p. 10-444, aug. 2010.

ORIMO, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated sdf-1/cxcl12 secretion. **Cell**, v. 121, n. 3, p. 335-348, may 2005.

ORISAKA, M. et al. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 734-740, 2006.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 147-156, feb. 2008.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-28, 1994.

PICUT, C.A. et al. Ovarian follicle counts using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and semi-automated image analysis in rats. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 5, p. 674-679, may 2008.

POTTER, S.M. et al. Influence of stromal-epithelial interactions on breast cancer in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, Feb. 2011.

QUIROS, R.M. et al. Ovarian normal and tumor-associated fibroblasts retain in vivo stromal characteristics in a 3-d matrix-dependent manner. **Gynecologic Oncology**, v. 110, n. 1, p. 99-109, jul. 2008.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 17, p. 2713-2713, oct. 2010.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of genes expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 725-751, dec. 1994.

RUTTEMAN, G.R.; MISDORP, W. Hormonal background of canine and feline mammary tumours. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, supp., p. 483-487, 1993.

RUTTEMAN, G.R. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. **In Vivo**, v. 4, n. 1, p. 33-40, jan-feb. 1990.

SHARABIDZE, N.; SABAKHTARASHVILI, M.; BURKADZE, G. Proliferation and apoptosis in ovarian stromal hyperplasia and hyperthecosis. **Georgian Medical News**, n. 129, p. 26-29, dec. 2005.

SLUIJMER, A.V. et al. Relationship between ovarian production of estrone, estradiol, testosterone, and androstenedione and the ovarian degree of stromal hyperplasia in postmenopausal women. **Menopause**, v. 5, n. 4, p. 207-210, 1998.

SONGSASEN, N. et al. Follicular morphology, oocyte diameter and localisation of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, suppl. 2, p. 65-70, jul. 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 1, p. 113-119, sep. 2005.

TING, A.Y. et al. Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 130-135, 2007.

TOMÁNEK, M.; CHRONOWSKA, E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44, n. 4, p. 269-274, 2006.

TSAI, K.L.; CLARK, L.A.; MURPHY, K.E. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 6-7, p. 444-451, jul. 2007.

van den HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, apr. 2005.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunolocalization of androgen receptors in the ovary canine and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 711-721, nov. 2001a.

VERMEIRSCH, H. et al. Immunolocalization of progesterone receptors in the ovary canine and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 73-93, jul. 2001b.

VESANEN, M. Bovine uterine, cervical and ovarian cytosol estrogen and progesterone receptor concentrations in cystic ovarian disease. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, n. 1, p. 35-43, 1993

VESANEN, M. et al. Bovine uterine, cervical and ovarian estrogen and progesterone receptor concentrations. **Animal Reproduction Sciences**, v. 26, n. 1-2, p. 61-71, nov. 1991.

VOGEL, P.M. et al. The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. **The American of Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 23-34, jul. 1981.

WOODWARD, T. L. et al. Fibronectin and the  $\alpha 5\beta 1$  integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 3214-3222, 2001.

YOUNG, J.M.; MCNEILLY, A.S. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, p. 489-504, oct. 2010.

#### 4 CONCLUSÕES

- A coloração Tricrômico de Masson não permite uma análise adequada da morfologia das células do estroma ovariano.
- O método imunistoquímico com anticorpo anti-PCNA permite uma melhor visualização das características celulares e da disposição das células do estroma ovariano quando comparado com as colorações histoquímicas de Hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson.
- O estroma ovariano canino é composto, principalmente, por células fusiformes e intersticiais (epitelióides) em proporções semelhantes.
- O índice de proliferação e a densidade celular do estroma ovariano canino, próximo aos folículos terciários, não foram neste estudo alterados devido à presença de neoplasia mamária na cadela.
- O índice de proliferação e a densidade celular das células do estroma ovariano, próximo aos folículos terciários, não sofrem alterações em decorrência do porte físico do animal.
- As cadelas com neoplasia mamária com idade entre 4 a 12 anos exibem uma densidade celular do estroma ovariano, próximo aos folículos terciários, maior do que as com 13 a 15 anos.

**ANEXOS**

**ANEXO A**

## Lista de Reagentes e Produtos

1. Ácido acético glacial P.A. (CH<sub>3</sub>COOH) P.M. 60,05 (Vetec®)
2. Ácido fosfomolibdúico P.A. ACS (H<sub>3</sub>[P(Mo<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>]. xH<sub>2</sub>O (Vetec®)
3. Ácido fosfotúngstico P.A. (H<sub>3</sub>[P(W<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>]. xH<sub>2</sub>O (Vetec®)
4. Peróxido de hidrogênio 30%(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) P.M. 34 (Vetec®) (Perhydrol®)
5. Álcool etílico absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) P.M. 46,07 (Quimidrol®)
6. Amplificador HiDef Detection® HRP System (Cell Marque®)
7. Anticorpos anti-PCNA (clone PC10) (Zymed®)
8. Anticorpos secundários HiDef Detection® HRP System (Cell Marque®)
9. Azul de Anilina (C<sub>32</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub>) P.M. 737,74 (Vetec®)
10. Bicarbonato de sódio P.A.( NaHCO<sub>3</sub>) P.M. 84,01 (Cinética Químicac®)
11. Tampão Citrato de sódio 10mM/pH 6,0 (KO35) (Diagnostic BioSystems®)
12. DAB HiDef Detection® HRP System (Cell Marque®)
13. Eosina Y (C<sub>20</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (Vetec®)
14. Escarlate de Biebrich (HOC<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N:NC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(SO<sub>3</sub>Na)) P.M. 556,49 (Sigma®)
15. Etilenoglicol(CH<sub>2</sub>OHCH<sub>2</sub>OH) P.M. 62,07 (Vetec®)
16. Floxina B (C<sub>20</sub>H<sub>2</sub>OBr<sub>4</sub>C<sub>14</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) P.M. 829,64 (Vetec®)
17. Fucsina ácida (C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub>) P.M. 585,54 (Vetec®)
18. Hematoxilina (C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) P.M. 404,31 (Vetec®)
19. Iodato de sódio (NaIO<sub>3</sub>) P.M. 197,89 (Reagen®)
20. Leite em pó desnatado (Molico®)
21. PBS 0,015 mol/L com pH 7,2 (LaborClin®)
22. Sulfato de Amônio e alumínio Dodecahidratado (NH<sub>4</sub>Al(SO<sub>4</sub>). x12H<sub>2</sub>O) P.M. 453,33 (Vetec®)
23. Sulfato de magnésio Heptahidratado ((MgSO<sub>4</sub>) .xH<sub>2</sub>O) P.M. 585,54 (Vetec®)
24. Xileno (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>) P.M. 106,17 (Quimidrol®)

## ANEXO B

### Soluções

❖ Soluções utilizadas nas colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson

- **Solução Hematoxilina de Gill**

- Água Reagente Tipo II	730 ml
- Etilenoglicol	250 ml
- Hematoxilina	2,0 gr
- Iodato de sódio	0,2 gr
- Sulfato de amônio e alumínio dodecadrado	17,6 gr
- Ácido acético glacial	20 ml

Preparo:

- Dissolver os reagentes na ordem acima citada com auxílio de um agitador magnético em temperatura ambiente;
- Ajustar o pH da solução para 2,0 a 3,0 e a densidade acima ou próxima de 1,040 g/l.
- Armazenar em frasco âmbar.

- **Solução de Scott**

- Água Reagente Tipo II	1000 ml
- Sulfato de magnésio heptahidratado	10,0 gr
- Bicabornato de sódio	2,0 gr

Preparo:

- Dissolver o sulfato de magnésio na água reagente tipo II, com auxílio de um agitador magnético;
- Adicionar o bicarbonato de sódio e homogeneizar até sua total dissolução.
- Ajustar o pH da solução acima de 7,8.
- Armazenar em frasco âmbar.

❖ Soluções utilizadas na coloração de Tricrômico de Masson

• **Diferenciador de Masson**

- Água Reagente Tipo II      500 ml
- Ácido fosfomolibídico      12,5 gr
- Ácido fosfotúngstico      12,5 gr

Preparo:

- Dissolver o ácido fosfotúngstico em água reagente tipo II, com auxílio de um agitador magnético;
- Adicionar o ácido fosfomolibídico e continuar a homogeneização por 5 á 10 min;
- Armazenar em frasco âmbar.

• **Solução Azul de Anilina 2,5%**

- Água Reagente Tipo II      245 ml
- Azul de Anilina              6,25 gr
- Ácido acético glacial      5 ml

Preparo:

- Dissolver o Azul de Anilina em água reagente tipo II, com auxílio de um agitador magnético;
- Adicionar o ácido acético glacial;
- Armazenar em frasco âmbar.

• **Solução de Escarlate de Biebrich**

- Escarlate de Biebrich      4,5 gr
- Fucsina ácida              0,5 gr
- Ácido acético glacial      5,0 gr
- Água Reagente Tipo II      495 ml

Preparo:

- Dissolver o Escarlate de Biebrich em água reagente tipo II, com auxílio de um agitador magnético;
- Adicionar a fucsina ácida e continuar a homogenização até a sua dissolução;
- Adicionar o ácido acético glacial;
- Armazenar em frasco âmbar.

❖ Soluções utilizadas na coloração de Hematoxilina e Eosina

- **Solução Eosina**

- **Solução Estoque A**

- Água Reagente Tipo II      100 ml
- Eosina Y                              2,5 gr

Preparo:

- Aquecer até ferver a água reagente tipo II;
- Acrescentar a Eosina Y e homogeneizar a solução até total dissolução;
- Armazenar em frasco âmbar.

- **Solução Estoque B**

- Água Reagente Tipo II      100 ml
- Floxina B                              2,0 gr

Preparo:

- Aquecer até ferver a água reagente tipo II;
- Acrescentar a Floxina B e homogeneizar a solução até total dissolução;
- Armazenar em frasco âmbar.

- **Solução de Uso**

- Solução A	100 ml
- Solução B	100 ml
- Álcool etílico	790 ml

Preparo:

- Misturar a Solução A, Solução B e o álcool etílico;
- Homogeneizar a solução;
- Armazenar em frasco âmbar.

## ANEXO C

### Protocolo de técnicas

- **Tricrômico de Masson**

- 1 – Desparafinizar a lâmina na estufa em Xilol 1 (pré-aquecido) – 5 min
- 2 – Banho no Xilol 2 – 10 min
- 3 – Banho no Xilol 3 – 10 min
- 4 – Banho no álcool absoluto 1 – 10 min
- 5 – Banho no álcool absoluto 2 – 10 min
- 6 – Banho no álcool 95% 1 – 5 min
- 7 – Banho no álcool 95% 2 – 5 min
- 8 – Lavar em água corrente por 2 min
- 9 – Banho na solução de Hematoxilina de Gill – 35 minutos
- 10 – Lavar em água corrente por 2 min
- 11 – Banho na solução de Scott – 1 min
- 12 – Lavar em água corrente por 2 min
- 13 – Cobrir a lâmina com a solução de Escarlate de Biebrich – 15 min
- 14 – Lavar em água corrente por 2 min
- 15 – Cobrir a lâmina com Diferenciador de Masson – 5 min
- 16 – Lavar em água corrente por 2 min
- 17 – Cobrir a lâmina com Azul de Anilina 2,5%– 15 min
- 18 – Lavar em água corrente por 2 min
- 19 – Banho no álcool isopropílico 1
- 20 – Banho no álcool isopropílico 2
- 21 – Banho no Xilol 1
- 22 – Banho no Xilol 2
- 23 – Montar a lâmina com resina e lamínula.

- **Hematoxilina e Eosina**

- 1 – Desparifinizar a lâmina na estufa – 30 min
- 2 – Banho no Xilol em estufa – 10 min
- 3 – Banho no Xilol 1 – 10 min
- 4 – Banho no Xilol 2 – 10 min
- 4 – Banho no álcool absoluto 1 – 30 seg
- 5 – Banho no álcool absoluto 2 – 30 seg
- 6 – Banho no álcool 95% 1 – 30 seg
- 7 – Banho no álcool 80% 2 – 30 seg
- 8 – Lavar em água corrente por 1 min
- 9 – Banho na solução de Hematoxilina de Gill – 10 min
- 10 – Lavar em água corrente por 1 min
- 11 – Banho na solução de Scott – 1 min
- 12 – Lavar em água corrente por 1 min
- 13 – Banho no álcool 60% 1 – 30 seg
- 14 – Banho no álcool 80% 2 – 30 seg
- 15 – Banho no álcool 95% 1 – 30 seg
- 16 – Banho na solução de Eosina – 1 min
- 17 – Banho no álcool absoluto 3 – 30 seg
- 18 – Banho no álcool absoluto 4 – 30 seg
- 19 – Banho no álcool absoluto 5 – 30 seg
- 20 – Banho no xilol – 30 seg
- 21 – Banho no xilol – 30 seg
- 22 – Banho no xilol – 30 seg
- 23 – Montar a lâmina com resina e lamínula