

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR
DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 NA GLÂNDULA
PERIANAL NORMAL E NEOPLÁSICA EM CÃES.**

Rodrigo Storti Pereira
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR
DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 NA GLÂNDULA
PERIANAL NORMAL E NEOPLÁSICA EM CÃES.**

Rodrigo Storti Pereira

Orientadora: Profa. Adjunto Gisele Fabrino Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2011

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436a Pereira, Rodrigo Storti.
Avaliação imuno-histoquímica do marcador de proliferação celular Ki-67 em glândula perianal normal e em neoplásica de cães / Rodrigo Storti Pereira. - Araçatuba : [s.n.], 2011
63 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária

Orientadora: Profa. Gisele Fabrino Machado

1. Glândulas perianais 2. Ki-67 3. Neoplasias 4. Proliferação de células 5. Cães

CDD 636.70896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO STORTI PEREIRA – Nascido em São José do Rio Preto em 18 de abril de 1980. Possui graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Rio Preto (2004). Atualmente é professor do Centro Universitário de Rio Preto UNIRP. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Anatomia Patológica, Patológica Geral, Patologia Veterinária e Patologia Clínica, atuando principalmente nos seguintes temas: Neoplasias, marcadores tumorais e patologia clínica.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore; viaje; descubra. Conheça”.

Albert Einstein

“Pensamento que trás o sentimento é o que cria o comportamento”.

Antonio Marques Silva Pereira

DEDICATÓRIA

À minha família, Antonio Marques, Isabel, Juliana, Lara e Felipe, pela força e incentivo, principalmente nos momentos mais fracos da minha jornada, me incentivando e fazendo acreditar que seria possível.

Aos meus cães Mona e Lord, pelo apoio e companheirismo nos momentos que mais precisava. Sem vocês esse trabalho não seria realizado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado;

Pela oportunidade da realização deste trabalho.

Pelo exemplo de docente, médica veterinária, pesquisadora e ser humano.

Principalmente pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP), pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos meus amigos Guilherme, Augusto e Débora, por me ajudarem diretamente no desenvolvimento deste trabalho. E a todos que indiretamente me ajudaram.

Às professoras Maria Cecília e Maria Gisela Laranjeira, pelas correções e sugestões no Exame Geral de Qualificação.

Ao Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, com dedicatória ao Prof. Halim Atique Neto, Profa. Tábata Salum Calile Atique e ao Prof. Alan Peres Ferraz de Melo, pelo apoio, confiança, incentivo e acima de tudo por me concederem a possibilidade de realização deste trabalho. Meu muito obrigado de coração.

Às minhas grandes amigas, Tatiana, Cleide e Edna, por aguentarem a rotina pesada do laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” nos momentos de minha ausência e principalmente pelo apoio e incentivo que me deram nos momentos de recaída. Meu muito obrigado de coração.

Aos meus amigos Carla Daniela Dan de Nardo, Karina Ferreira de Castro, Lucas Bahdu Cossi, Alfredo Maia Filho, Talita F. B. Souza, pela amizade e incentivo.

À minha grande amiga Ana Silvia Dagnone, pela ajuda e colaboração na elaboração deste trabalho.

Ao meu grande amigo Felipe Augusto Ruiz Sueiro e Camila Montanari Ruiz do Laboratório de patologia VET PAT, localizado em Campinas –SP, por me ajudar de forma direta na realização deste trabalho. Sem suas ajudas, esse trabalho não seria realizado.

Ao Prof. Alessi, pela suas correções e sugestões na defesa da dissertação.

E a todos os animais que de forma direta, ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 2.1 Anatomia e Histologia das Glândulas Perianais..... | 15 |
| 2.2 Proteína Ki-67..... | 19 |
| 2.3 Aspectos Morfológicos das Neoplasias da Glândula Perianal..... | 21 |
| 3 OBJETIVOS | 26 |
| 4 MATERIAL E MÉTODO | 27 |
| 4.1 Animais..... | 27 |
| 4.2 Estudo Morfológico..... | 27 |
| 4.3 Imunoistoquímica para Detecção da Proteína Ki-67..... | 28 |
| 4.4 Avaliação da Marcação Imunoistoquímica da Proteína Ki-67..... | 28 |
| 4.5 Análise Estatística..... | 29 |
| 5 RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Avaliação Histopatológica | 31 |
| 5.2 Quantificação da Proliferação Celular Através da Detecção do Ki-67 em Glândula Perianal..... | 35 |
| 5.3 Informações Sobre o Histórico do Paciente..... | 38 |
| 6 DISCUSSÃO | 44 |
| 7 CONCLUSÃO | 49 |
| 8 REFERÊNCIAS | 50 |
| ANEXO | 60 |

AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI-67 NA GLÂNDULA PERIANAL NORMAL E NEOPLASICA EM CÃES.

RESUMO - A causa dos tumores da glândula perianal é desconhecida, entretanto eles podem ser modulados por influência de hormônios gonadais, basicamente a testosterona, uma vez que há uma alta prevalência (até 95%) de regressão da forma benigna dessa neoplasia após a castração dos machos. A proteína Ki-67 foi descrita pela primeira vez em 1983 é uma proteína não-histona, que não é expressa em células na fase G0, mas que pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular, G1, S, G2 e mitose. Verificou-se que o Ki-67 está associado com a proliferação celular, estando a população de células tumorais positivas ao Ki-67 correlacionada com a evolução clínica da doença. Foram estudados 42 casos de neoplasias da glândula perineal, sendo 15 adenomas, 15 epitelomas, 12 carcinomas. Foram utilizadas 13 amostras de tecido de glândula perianal normal, como controle. De cada animal foram obtidas informações como: sexo, idade, raça, presença de outras neoplasias, se castrado ou não, se em caso de fêmea havia o uso de anticoncepcional, tempo de evolução, recidiva e tempo de sobrevivência. Dos 42 casos de neoplasias de glândulas perianais, 34 (80,95%) foram provenientes de cães machos e 8 (19,05%) de fêmeas. A média de idade dos machos com a neoplasia foi de 9,8 anos, e das fêmeas 7,4 anos, sendo que para os dois sexos a idade variou de 5 a 15 anos. Em relação às raças, 11 (26,19%) eram S.R.D. (sem raça definida), 9 (21,42%) Poodle, 4 (9,52%) Cocker Spaniel e Husky Siberiano. O histórico de diagnóstico de outras neoplasias, foi constatado em 23,80% dos animais deste estudo. Em relação à castração, 32 (94,11%) dos machos não eram castrados e apenas 8 (19,05%) fêmeas eram. O tempo de evolução da neoplasia apresentou média de 1,2 anos. Histórico de recidiva da neoplasia foram relatados em 14 animais, sendo maior (66,66%) nos carcinomas. A marcação para o Ki-67 revelou que os carcinomas apresentaram maior taxa de proliferação celular (9,87%) quando comparados aos grupos dos epitelomas (2,92%) e adenomas (0,39%), apresentando diferença significativa na análise estatística. Portanto, este marcador mostrou-se efetivo para a classificação das neoplasias das glândulas perineais. Além disto, constatou-se que quanto maior o número de células marcadas para o Ki-67 nos carcinomas, maior foi a probabilidade de ocorrência de recidivas após o tratamento.

Palavras Chaves: Glândula Perianal, Ki-67, Neoplasia, Proliferação Celular

IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF THE CELL PROLIFERATION MARKER KI-67 IN NORMAL AND NEOPLASTIC PERIANAL GLANDS IN DOGS

SUMMARY - The cause of perianal gland tumors is unknown, though they may be modulated by the influence of gonadal hormones, primarily testosterone, since there is a high prevalence (up to 95%) of regression of the benign tumor after males castration. Protein Ki-67 was first described in 1983, and it is a non-histone protein, which is not expressed in G0 phase cells, but can be detected in the active phases of the cell cycle, G1, S, G2 and mitosis. It was found that Ki-67 is associated with cell proliferation, and the population of tumor cells positive for Ki-67 correlated with clinical outcome. In this present work we studied 42 cases of perineal gland neoplasms, being 15 adenomas, 15 epitheliomas and 12 carcinomas. We used 13 tissue samples of normal perianal gland as control. From each animal we obtained information such as gender, age, race, presence of other malignancies, neutering status, whether if there were female contraceptive use, duration, recurrence and survival time. Of the 42 cases of perianal gland neoplasms, 34 (80.95%) were from males and eight dogs (19.05%) females. The males average age with cancer was 9.8 years and 7.4 years for females and for both sexes aged between 5 and 15 years. In regard to race, 11 (26.19%) were no breed, 9 (21.42%) were Poodle, and 4 (9.52%) were Siberian Husky and Cocker Spaniels. The history of diagnosis of other cancers, was found in 23.80% of the animals in this study. In relation to castration, 32 (94.11%) of males were not castrated and only 8 (19.05%) were females. The progression of the tumor showed an average of 1.2 years. History of recurrence of cancer were reported in 14 animals, and was higher (66.66%) for carcinomas. Ki-67 staining revealed that the carcinomas showed higher proliferation rate (9.87%) compared to groups of epitheliomas (2.92%) and adenomas (0.39%), with significant differences in the statistical analysis. Therefore, this marker proved to be effective for the classification of perineal gland neoplasms. Moreover, it was found that the greater the number of Ki-67 cells stained in carcinomas, the higher the probability of relapse after treatment.

Keywords: Perianal Gland, Ki-67, Tumors, Cell Proliferation.

1 INTRODUÇÃO

A incidência de neoplasias nos animais domésticos, principalmente nos animais de estimação, vem aumentando a cada ano. Isto tem sido atribuído a uma maior expectativa de vida desses animais, e também a uma maior convivência dos animais com o homem, estando portanto os animais sujeitos à ação dos mesmos carcinógenos que podem afetar os seres humanos. Além disto, os meios de diagnóstico de neoplasias têm sido aprimorados, recebendo maior atenção por parte dos profissionais veterinários, resultando em um aparente aumento da incidência, além da necessidade de se estabelecer novos critérios de diagnóstico, classificação e estadiamento dos tumores (PRIESTER, 1980; ROSSETTO et al., 2009).

Segundo Fighera et al. (2008) em um levantamento realizado na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Brasil, em relação à causa de morte, as neoplasias aparecem em segundo lugar, perdendo somente para as doenças infecciosas ou parasitárias. Há dados que evidenciam a maior frequência de neoplasias na espécie canina quando comparada à população humana. Assim, são relatados 360 casos de neoplasias para cada 100.000 cães e 272 casos para cada 100.000 humanos (PRIESTER, 1980). As neoplasias cutâneas são as observadas com maior frequência em cães, tanto em estudos realizados em outros países (VASCELARI et al., 2009; ADAMS et al., 2010) como no Brasil (ROSSETTO et al., 2009). Dentre as neoplasias cutâneas mais comuns nesta espécie, merecem atenção as oriundas dos anexos cutâneos, particularmente aquelas que acometem as glândulas perianais (BRODEY, 1970).

A etiologia relacionada ao aparecimento de neoplasias da glândula perianal é desconhecida, entretanto, parece haver modulação da proliferação celular por influência de hormônios gonadais (PULLEY e STANNARD, 1990; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; HARGIS, 1998; SCOTT et al., 2001; MEDLEAU e HNILICA, 2003), basicamente a testosterona (YAGER e WILCOCK, 1994; WITHROW, 2001; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002;

FINEMAN, 2004). A influência da testosterona na etiologia das neoplasias destas glândulas é reforçada, pela alta prevalência (até 95%) de regressão da forma benigna da neoplasia após a castração dos machos (BURROWS e ELLISON, 1992; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994; WILKINSON e HARVEY, 1996; HARGIS, 1998; MILLER e GRIFFIN, 2001; MEDLEAU e HNILICA, 2003; SCOTT; FINEMAN, 2004).

A proteína Ki-67 foi descrita pela primeira vez em 1983 está relacionada estritamente à proliferação celular, onde, não é expressa em células na fase G0, mas que pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular, G1, S, G2 e mitose (GERDES et al. 1991), apresentando uma vida média de menos de uma hora (BRUNO e DARZYNKIEWIKZ, 1992). Verificou-se que o Ki-67 está associado com a proliferação celular, estando a fração de células tumorais positivas ao Ki-67 correlacionada com a evolução clínica da doença (GERDES et al. ,1992).

Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas (GERDES et al., 1991), pois diagnostica a síntese do DNA da neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este marcador (SASAKI et al. 1987).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão da proteína Ki-67 em glândulas perianais normais de cães e em glândulas com neoplasias benignas e malignas. Como complementação a este estudo foi analisado o histórico clínico e as informações da anamnese descritas nos prontuários dos cães.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Anatomia e Histologia das Glândulas Perianais

O períneo é a região de saída pélvica limitada dorsalmente pela cauda e ventralmente pelo escroto no cão macho, na fêmea, é uma região limitada pela comissura dorsal da vulva e pela pele que cobre o músculo obturador interno e glúteo superficial paralelo à tuberosidade do ísquio lateral. Essa região apresenta três tipos de glândulas importantes: as glândulas perianais, as glândulas anais e as glândulas dos sacos anais (EVANS et al., 1993) (FIGURA 1).

As glândulas perianais foram descritas pela primeira vez em 1923 (NIELSEN e ATTOSMIS, 1964; SHABADASH e ZELIKINA, 2002) (FIGURA 2). Essas glândulas apresentam dimorfismo sexual. Nas fêmeas adultas sobrevém uma acentuada e significativa regressão com características estruturais que sugerem uma degeneração por formarem ilhas isoladas de células. Já nos machos formam camadas glandulares sólidas entre as camadas da pele, suplantando em número todos os outros tipos glandulares. Nos filhotes (entre 1-38 dias), de ambos os sexos, não existem diferenças evidentes e, se desenvolvem rapidamente nos machos adultos. Nos filhotes do sexo feminino o desenvolvimento é rápido e com 38 dias, o tamanho absoluto das glândulas é três vezes o das fêmeas adultas (SHABADASH e ZELIKINA, 2002).

As glândulas perianais, também chamadas de circum-anais ou hepatóides, são glândulas sebáceas modificadas (HARGIS, 1998; BRAGULLA et al., 2004), encontradas em muitas espécies de carnívoros e bovídeos (BLAZQUEZ et al., 1988; NIELSEN; ATTOSMIS, 1964; SHABADASH e ZELIKINA, 2002). Localizam-se no tecido subcutâneo, ao redor da junção anocutânea, na base da cauda e região do prepúcio (MEUTEN et al., 1983; GOURLEY e GREGORY, 1992).

O termo hepatóide é utilizado para denominar essa glândula devido à semelhança histológica que suas células têm com os hepatócitos.

Histologicamente as glândulas perianais formam lóbulos circundados por células basais indiferenciadas e achatadas, e por células poligonais diferenciadas (JONES et al., 2000; WILKINSON e HARVEY, 1996; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

As glândulas perianais estão localizadas ao redor do ânus na zona anocutânea e podem medir de 4 cm de largura e uma espessura de 8mm (GOLDSCHMIDT e ZOLTOWSKI, 1981; PULLEY e STANNARD, 1990; GOLDSCHMIDT et al., 1998; GROSS et al., 2005).

As glândulas perianais, apesar de estarem presentes nas famílias Canidae e Bovidae, não ocorrem na família Felidae (HOLT, 1985; SHABADASH e ZELIKINA, 2002). Entre os mamíferos silvestres, os macacos são os únicos representantes além de alguns roedores (HOLT, 1985; ESPLIN et al., 2003).

Sua função ainda não está bem estabelecida, porém, sugere-se a possibilidade de produção endócrina ou secreção de feromônios (ESPLIN et al., 2003). As glândulas perianais produzem grande quantidade de secreção rica em proteínas; o odor das suas secreções parece ser essencial na comunicação entre cães durante a delimitação do território e reconhecimento da identidade (SHABADASH e ZELIKINA, 2002). Ainda, de acordo com Shabadash e Zelikina (1995), as células das glândulas perianais são exócrinas e suas células secretam proteínas para canais intercelulares e destes aos ductos e canais pilosos. Podem ser consideradas glândulas de odor, sendo que sua secreção cobre a superfície da região perineal, sendo preservada nas fezes como um marcador olfatório.



FIGURA 1: Anatomia perineal normal (EVANS, HOWARD; SUSAN, 1993)

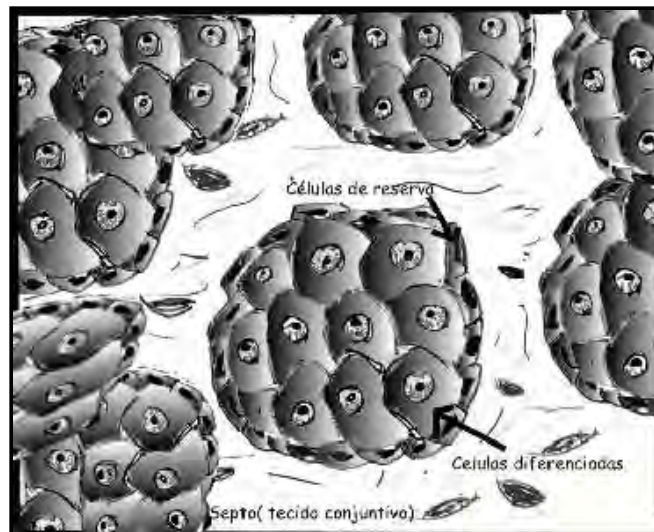


FIGURA 2: Organização histológica da glândula perianal normal. Observam-se vários lóbulos das glândulas perianais com as células de reserva (basais) e as células diferenciadas em meio ao estroma (SHABADASH e ZELIKINA, 1995).

2.2 Proteína Ki-67

A proteína Ki-67 foi descrita pela primeira vez em 1983 e esta relacionada estritamente à proliferação celular. Esta proteína se encontra associada à matriz nuclear, localizada no córtex nucleolar, com meia vida de 90 minutos (GERDES et al., 1983; HEIDEBRECHT, 1996). A ativação do gene Ki-67 durante o ciclo celular está ocorre nas fases S, G2, M e está ausente em G0. Entretanto resultados variam em G1: células passando pelos eventos precoces da mitose, na transição de G0 para G1 perdem o Ki-67, enquanto células em G1, e após a mitose são constantemente Ki-67 positivas (SCHOLZEN e GERDES, 2002).

Verificou-se que a maior produção de Ki-67 está associada com a proliferação celular, estando a população de células tumorais com marcação positiva para a proteína Ki-67 relacionada com o crescimento da neoplasia e a evolução clínica da doença (GERDES et al. ,1992). Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como indicador do comportamento biológico das neoplasias malignas (GERDES et al., 1991), pois o aumento da marcação de células malignas com este antígeno reflete aumento da síntese de DNA pelas células em proliferação (SASAKI et al. , 1987).

Outro aspecto que merece ser enfatizado é a definição das margens cirúrgicas pela detecção de marcação para a proteína Ki-67, que pode demonstrar a invasão tumoral por vezes não detectada à microscopia de luz, sendo o aumento de sua positividade determinante de índices de mau prognóstico (LAZZARO e CLEVELAND, 2000).

Vale ressaltar que a positividade do Ki-67 não é exclusiva das neoplasias malignas, mas sim predominante quando comparada às neoplasias benignas dos tecidos glandulares (MURAKAMI et al., 1992; GIANNONI et al. , 1995). Portanto, a Ki-67 é melhor marcador de transformação maligna servindo para diferenciar, por exemplo, o carcinoma e adenoma pleomórfico (COOPER, 1993).

Finalmente, alguns autores relatam que a positividade da proteína Ki-67 em carcinomas glandulares pós-irradiação pode servir como marcador de recidiva (VALENTE, 1994), sendo tanto maior o número de células positivas quanto maior a malignidade da neoplasia (VARGAS, 1997; LAZZARO e CLEVELAND, 2000).

Desta forma, o uso de anticorpos específicos para detectar a proteína Ki-67 abre caminho para o acesso à proliferação celular, particularmente útil em numerosos estudos de valor prognóstico da proliferação celular em neoplasias humanas (BOUZUBAR et al., 1989). Muitos estudos tentam mostrar a relação entre o número de células Ki-67 positivas e o bom ou mau prognóstico em relação ao câncer de mama em humanos (BRODEY et al., 1983; PELETEIRO, 1994; PEÑA et al., 1998; FITZGIBBONS, 2000). Também em animais, trabalhos como os de Zuccari (1999) aponta o Ki-67 como um excelente marcador de proliferação celular no prognóstico de carcinomas mamários em cadelas. Além de neoplasias mamárias, este anticorpo tem sido amplamente utilizado em exames diagnóstico na Medicina Veterinária, na tentativa de se estabelecerem relações entre os índices proliferativos e o comportamento clínico, o prognóstico e os índices apoptóticos de diversas neoplasias (GRIFFEY et al., 1999; ROELS et al., 1999; ROELS et al., 2000; MADEWELL, 2001), como no astrocitoma (MCKEEVER et al., 1998), carcinomas ovarianos (KRITPRACHA et al., 2005) e linfomas (KIUPEL et al., 1999; MADEWELL, 2001).

Comparado com outros marcadores de proliferação celular, o Ki-67 têm mostrado superioridade por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos como o PCNA. Além disso, sua expressão nuclear ocorre num período definido do ciclo celular, o que em contraste com o PCNA, pode representar uma vantagem em relação ao seu emprego como marcador biológico (GERDES et al. 1992).

2.3 Aspectos Morfológicos das Neoplasias da Glândula Perianal

Tanto o adenoma quanto o epiteloma de glândula perianal são neoplasias comuns de cães (GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992). Esses tumores acometem cães velhos, entre 8 e 13 anos de idade e ocasionalmente cães jovens (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Os machos inteiros são mais afetados do que as fêmeas e os machos castrados (SCOTT et al., 2001; WITHROW, 2001; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; MEDLEAU e HNILICA, 2003; FINEMAN, 2004). E as raças mais acometidas incluem: Cocker Spaniel, Spaniel Britânico, Buldogue Inglês, Pastor Alemão, Beagle, Husky Siberiano, Shih-Tzu, Pequinês e Lhasa Apso (BURROWS e ELLISON, 1992; GROSS et al., 1992; WILKINSON e HARVEY, 1996; SCOT et al., 2001; WITHROW, 2001; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Em uma avaliação de 2.725 adenomas perianais, os locais afetados foram: períneo (89,0%), cauda (7,0%) e abdômen (3,0%). Outras localizações foram vistas em apenas 1,0% dos casos (GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992)

Macroscopicamente, tanto os adenomas, os epitelomas e os carcinomas perianais são vistos como nódulos ou massas solitárias ou múltiplas, de tamanhos variáveis e frequentemente ulcerados (GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; WILKINSON e HARVEY, 1996; HARGIS, 1998; SCOTT et al., 2001; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Ao corte, esses tumores são de cor marrom, multilobulados e apresentam múltiplos focos de hemorragia. (PULLEY e STANNARD, 1990; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

Histologicamente, os adenomas e os epitelomas perianais consistem de uma proliferação de células poliédricas agrupadas em cordões, ninhos ou trabéculas circundados por pequena quantidade de tecido conjuntivo fibroso (PULLEY e STANNARD, 1990; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; JONES et al., 2000; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002) fibrovascular (GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002) ou mixóide (JONES et al., 2000). Essas células apresentam abundante citoplasma

eosinofílico e finamente granular, com núcleo grande, central, oval e formado por cromatina vesicular, com um pequeno nucléolo pouco evidente (PULLEY e STANNARD, 1990; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; JONES et al., 2000; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; MEDLEAU e HNILICA, 2003). O aparecimento de células binucleadas é um achado comum, o pleomorfismo é discreto e mitoses são raramente observadas (GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994; MEDLEAU e HNILICA, 2003). Outra característica importante e que serve para diferenciar adenomas de epitelomas é a distinta monocamada de células basais de reserva que é vista como que revestindo os lóbulos glandulares dos adenomas (YAGER e WILCOCK, 1994; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Essa camada pode ser muito espessa nos epitelomas e demonstrar acentuada atividade mitótica. (GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

A pele que reveste os nódulos está freqüentemente erodida ou ulcerada e, quando isso ocorre, há acentuada inflamação supurativa associada a bactérias intralesionais na derme (GROSS et al., 1992). A metaplasia escamosa também é considerada um achado comum, (PULLEY e STANNARD, 1990; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994; MEDLEAU e HNILICA, 2003), assim como a formação de pérolas de queratina (YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994), e tem sido interpretada por alguns especialistas como focos de diferenciação ductal. (GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Duas variantes são descritas para o adenoma perianal e estão relacionadas aos componentes estromais proeminentes, que são vasos sangüíneos proeminentes (variante angiomatóide) ou tecido adiposo (variante adiposa) (GROSS et al., 1992).

O prognóstico dessa neoplasia em cães é favorável, pois as lesões envolvem em até 95% dos cães machos após a castração, (BURROWS e ELLISON, 1992; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994; WILKINSON e HARVEY, 1996; HARGIS, 1998; MEDLEAU e HNILICA, 2003; SCOTT et al., 2001; FINEMAN, 2004). Entretanto, podem

ulcerar e sangrar com freqüência, provavelmente em decorrência de autotraumatismo (BURROWS e ELLISON, 1992; SCOTT et al., 2001).

Muitos dos cães afetados por adenomas ou epitelomas perianais apresentam também pequenas lesões glandulares focais diagnosticadas como hiperplasia, e alguns autores atribuem a essas proliferações uma provável transformação em neoplasias (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Além disso, em alguns casos, adenomas perianais demonstram clinicamente uma característica invasiva, não determinada pela histologia. Essa variante clínica é conhecida como adenoma perianal invasivo e o seu desconhecimento pode trazer confusão entre clínicos e patologistas (WITHROW, 2001).

O carcinoma de glândula perianal é uma neoplasia pouco comum em cães (GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Ao contrário dos adenomas, os carcinomas parecem não ser influenciados por hormônios gonadais, (GROSS et al., 1992; WITHROW, 2001) e são relativamente mais comuns em machos e fêmeas castradas, (YAGER e SCOTT, 1993), embora alguns autores não aceitem esta opinião (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

Os cães são acometidos dos quatro aos 15 anos de idade, com pico de incidência de oito a 12 anos. (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Embora a maioria dos autores afirme que não há predisposição racial, os cães das raças Samoieda, Husky Siberiano, Shih-Tzu e o Pastor Alemão parecem ser os mais afetados (WILKINSON e HARVEY, 1996; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). Macroscopicamente, os carcinomas perianais são vistos como nódulos que crescem de forma rápida, apresentam no mínimo 2 cm de diâmetro, são firmes, não circunscritos e frequentemente ulcerados (GROSS et al., 1992; JONE et al., 2000; MEDLEAU e HNILICA, 2003). Uma proliferação placóide ao redor do ânus, semelhante a um anel, é vista com certa freqüência e pode ser macroscopicamente confundida com fístula perianal (furunculose anal), principalmente em cães da raça Pastor Alemão. (BURROWS e ELLISON, 1992; MEDLEAU e HNILICA, 2003).

Histologicamente, os carcinomas perianais consistem de uma proliferação de células poliédricas agrupadas em ninhos ou dispostas em um padrão sólido com quantidade variável de estroma fibroso (YAGER e WILCOCK, 1994; JONES et al., 2000). As células podem apresentar-se idênticas às descritas para os adenomas nos casos de carcinomas bem diferenciados (GROSS et al., 1992) ou apresentarem moderada quantidade de citoplasma eosinofílico e núcleo grande, redondo e formado por cromatina frouxa a vacuolada, em muitos casos com um ou mais nucléolos conspícuos (YAGER e WILCOCK, 1994). Essas células que caracterizam os carcinomas menos diferenciados são denominadas por alguns autores como células tipo juvenil. (YAGER e WILCOCK, 1994). O pleomorfismo é acentuado e a atipia é variável, mas freqüentemente moderada. (GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). As mitoses são comuns (PULLEY e STANNARD, 1990; GROSS et al., 1992; YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e WILCOCK, 1994; HARGIS, 1998; MEDLEAU e HNILICA, 2003), e muitas delas são atípicas, podendo ser observado três ou mais fusos (GROSS et al., 1992).

A invasão para o tecido conjuntivo e interior do dos vasos linfáticos são achados freqüentes. (GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). O epitélio que reveste os nódulos é ulcerado e, da mesma forma que foi descrito para os adenomas e epitelomas, ocorre inflamação e proliferação de tecido fibrovascular na derme adjacente (GROSS et al., 1992).

O diagnóstico diferencial dos carcinomas perianais em cães deve incluir o carcinoma de glândula do saco anal, o carcinoma de glândula anal, mais pela localização do que pelo aspecto clínico ou histológico (BURROWS e ELLISON, 1992). Outros diferenciais são o carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, o carcinoma sebáceo (GROS et al., 1992) e o carcinoma apócrino (GROSS et al., 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

O prognóstico dessa neoplasia em cães é reservado, pois metástases ocorrem em até 30% dos casos (SCOTT et al., 2001), principalmente nos linfonodos sacrais e sublobares. (YAGER e SCOTT, 1993; YAGER e

WILCOCK, 1994; WILKINSON e HARVEY, 1996; JONES et al., 2000; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; MEDLEAU e HNILICA, 2003; FINEMAN, 2004). O tempo médio de vida dos cães com metástases confirmadas é de aproximadamente sete meses (FINEMAN, 2004).

Em um estudo realizado com neoplasias oriundas da glândula perianal, os cães com proliferações maiores do que 5 cm de diâmetro apresentaram risco 11 vezes maior de morrer de causas relacionadas aos tumores (SCOTT et al., 2001). Isso demonstrou uma relação direta entre o tamanho da massa perianal e a sua malignidade (SCOTT et al., 2001).

3 OBJETIVOS

O principal objetivo do presente estudo foi caracterizar a proliferação celular através de imuno-histoquímica para a detecção do marcador Ki-67 em glândula perianal normal e neoplásica de cães, e desta forma verificar o padrão de marcação e o possível valor prognóstico desta proteína para as alterações neoplásicas destas glândulas.

Como complementação a este estudo foi analisado o histórico clínico e as informações da anamnese descritas nos prontuários dos cães.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram estudados 42 casos de neoplasias da glândula perianal, dentre eles 15 adenomas, 15 epitelomas e 12 carcinomas.

As amostras foram obtidas nos arquivos do laboratório VETPAT, recuperadas no período entre 2005 a 2008. A seleção foi feita de maneira aleatória, levando-se em conta apenas a disponibilidade de material em boa quantidade incluído em parafina. Após a seleção dos blocos, a ficha dos animais foi resgatada para a colheita das outras informações relatadas neste estudo.

As glândulas perianais normais (n=13) foram obtidas de cães submetidos à necropsia da rotina do departamento de clínica médica do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique” – UNIRP. Dos 42 casos de neoplasias de glândulas perianais foram colhidas informações referentes a sexo, idade, raça. Também foram verificadas informações sobre, histórico reprodutivo (castração e uso de anticoncepcional) o tempo de evolução, ocorrência de recidiva, tempo de sobrevivência.

4.2 Estudo morfológico

Fragments do tecido glandular foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina, e submetidos ao estudo morfológico e imuno-histoquímico. Cortes histológicos de 5 micrômetros foram obtidos dos blocos de parafina e corados com hematoxilina eosina (HE) foram utilizados para o estudo morfológico, seguindo os critérios da Organização Mundial de Saúde para Classificação dos Tumores Glandulares dos Animais Domésticos (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

4.3 Imuno-histoquímica para detecção da proteína Ki-67

Para localização da proteína Ki-67 utilizou-se o método imuno-histoquímico da streptoavidina-biotina-peroxidase. Foi realizada a recuperação antigênica em panela à vapor durante 30 minutos em tampão citrato pH 6,0. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução para bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi aplicada solução de leite em pó desnatado a 3% por 30 minutos e em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-Ki-67 (MIB-1 Novocastra), na diluição de 1:100 em câmara úmida a 4°C por 18-22 horas. O anticorpo secundário foi o anticorpo universal biotilado pronto para uso (DAKO K0690) incubado por 45 minutos, em câmara úmida.

Após lavagem foi aplicado o complexo streptoavidina com peroxidase pronto para uso (DAKO K0690) incubado também por 45 minutos, em câmara úmida. A lavagem padrão foi realizada por três vezes de 5 minutos cada em PBS pH 7,4, foi realizada entre todas as etapas, exceto após o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado. A reação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina). Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, desidratados em seqüência de banhos em etanóis com concentrações crescentes, diafanizados com xilol, e montados em bálsamo do Canadá sob lamínula.

4.4 Avaliação da marcação imuno-histoquímica da proteína Ki-67

Para a quantificação das células Ki-67 positivas, os cortes histológicos foram avaliados com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada. O sistema utilizado foi o Image Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics). Uma vez calibrado o sistema, foi realizada a captura de imagem de três áreas distintas. Cada núcleo imunomarcado com anticorpo Ki-67, com coloração marrom conferida pelo cromógeno DAB, foi selecionado e marcado em vermelho. Em seguida os núcleos de coloração azul arroxeados, corados

pela hematoxilina foram selecionados e marcados em amarelo (FIGURA 3). Do total de área nuclear marcada, foi verificada a porcentagem da área marcada com o Ki-67.

4.5 Análise Estatística

As médias da marcação nuclear de cada grupo foram comparadas utilizando-se o Teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, no nível de 5% de significância. A comparação da marcação para Ki-67 entre os cães com carcinoma, quanto à presença ou não de recidivas foi realizada pelo teste Mann Whitney ($p < 0,05$).

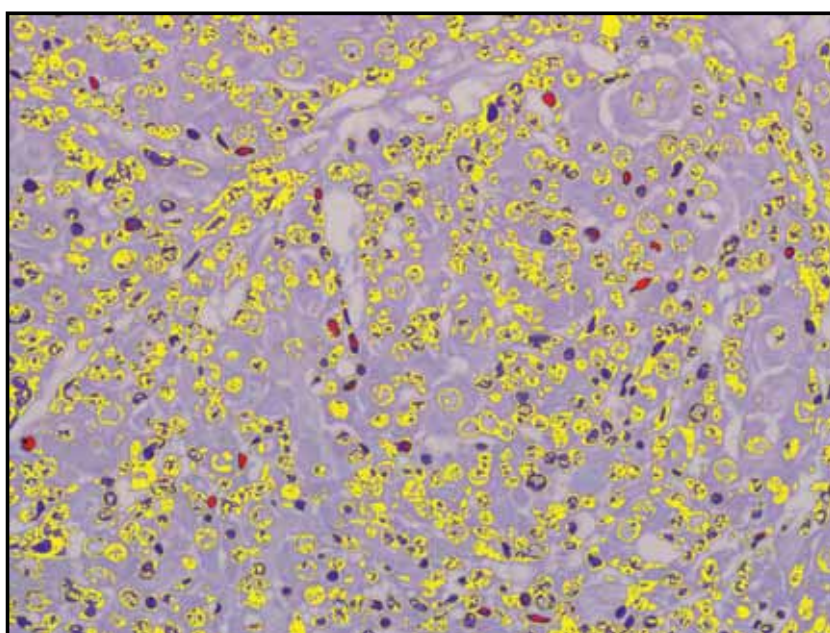


FIGURA 3: Imagem digitalizada, utilizando o software de análise de imagens Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). Núcleos vermelhos são positivos para K-67 e núcleos amarelos são negativos para Ki-67

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Histopatológica

Os adenomas foram caracterizados pela presença de células epiteliais com baixo pleomorfismo nuclear, citoplasma abundante e eosinofílico e a camada de células basais com núcleo pequeno e hipercoreado. As células se apresentaram dispostas em ilhas separadas por tecido conjuntivo bem vascularizado (FIGURA 4A). Os epitelomas apresentam lóbulos constituídos de células epiteliais com citoplasma abundante e eosinofílico e baixo pleomorfismo nuclear. Estas neoplasias se caracterizaram pela presença de células basalóides com núcleos maiores, cromatina frouxa e nucléolos evidentes e presença de raras figuras de mitose. Em algumas amostras foram observadas áreas focais de metaplasia escamosa. A disposição em ilha dos grupamentos celulares separada por tecido conjuntivo ainda estava presente (FIGURA 5A). Foram observadas áreas com presença de células, com núcleos hipercoreados e nucléolos mais evidentes, citoplasma pouco definido e com presença de uma quantidade maior de figuras de mitose, sugerindo a transformação maligna dessas neoplasias. Foram observadas também áreas focais de infiltrado inflamatório rico em macrófagos e linfócitos.

Os carcinomas se caracterizaram por apresentar proliferação celular em arranjo sólido (FIGURA 6A). As células apresentam baixo pleomorfismo nuclear, núcleo grande, claro, cromatina frouxa e nucléolos evidentes, o citoplasma das células apresentava os bordos pouco definidos e as mitoses eram mais freqüentes do que as observadas no epiteloma. Foram observadas extensas áreas de hemorragia associada com um intenso infiltrado inflamatório rico em linfócitos e macrófagos, permeados na região de ulceração da derme.

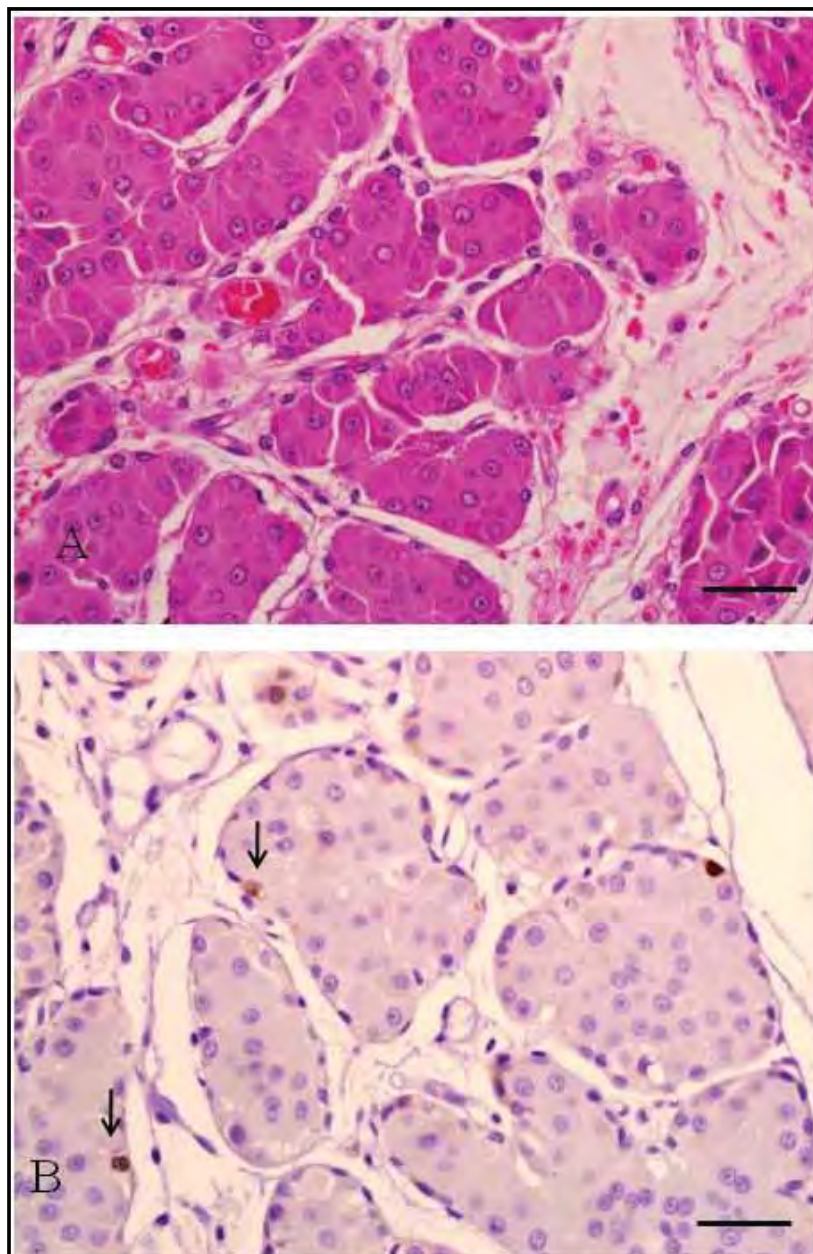


Figura 4: Corte histológico de neoplasias da glândula perianal de cão. **A e B** Adenoma: Observar células poliédricas agrupadas em ninhos circundadas por pequena quantidade de tecido conjuntivo fibroso (A) Observar raros núcleos positivos para Ki-67 (setas, em B). (A hematoxilina-eosina; B - imunistoquímica para Ki-67, streptoavidina-biotina peroxidase revelado por DAB, barra = 50 μ m).

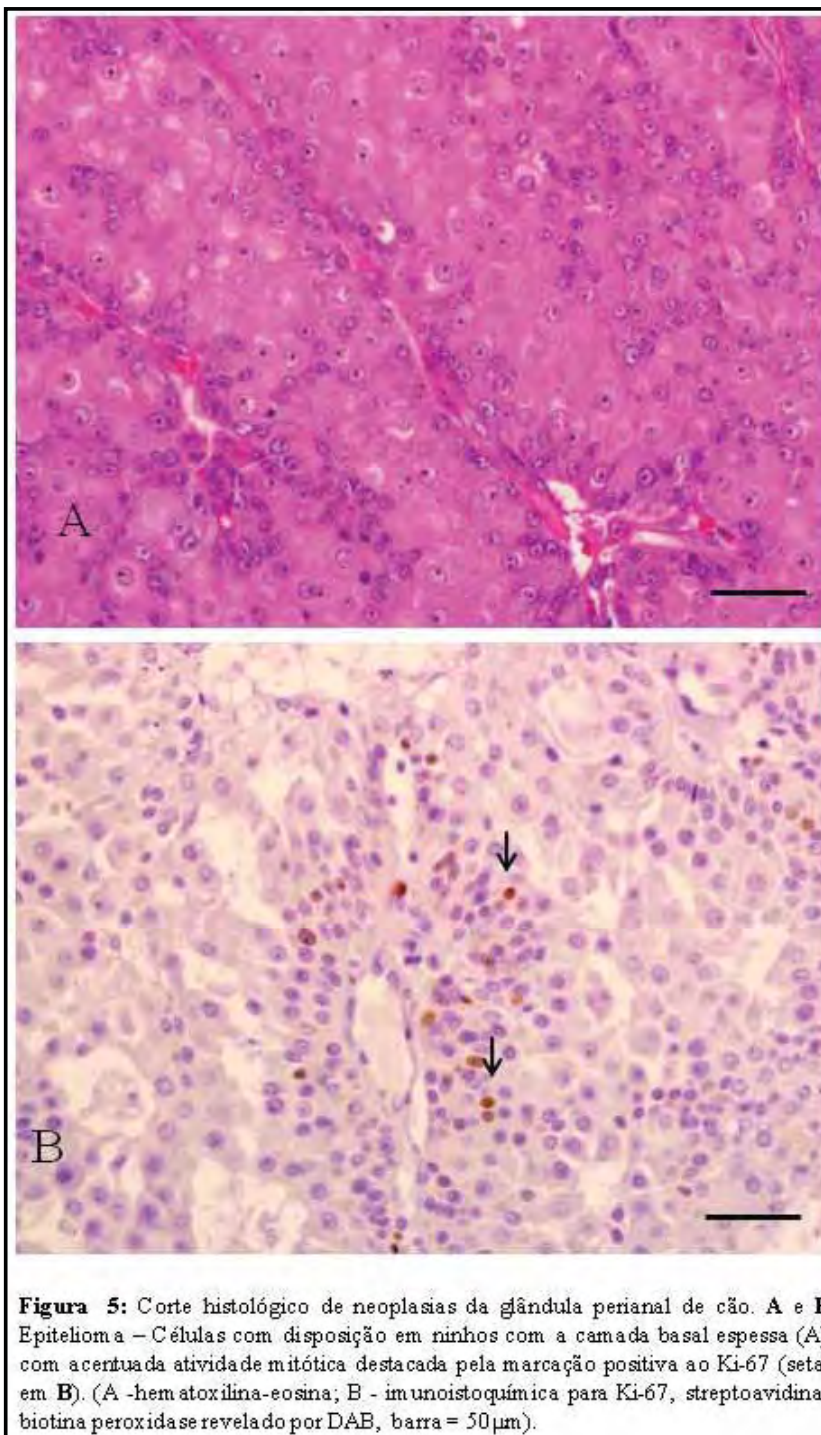
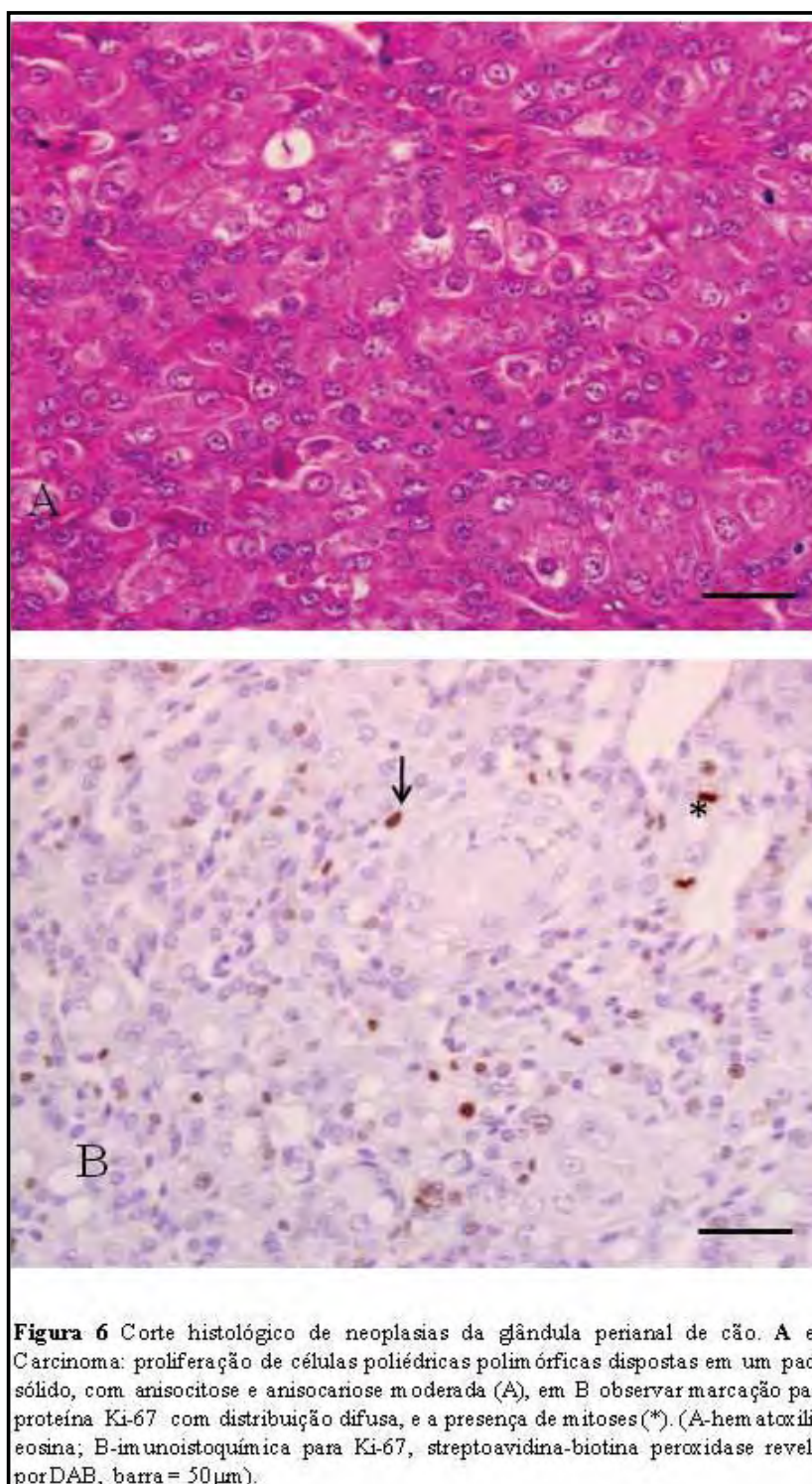


Figura 5: Corte histológico de neoplasias da glândula perianal de cão. **A e B** Epitelioma – Células com disposição em ninhos com a camada basal espessa (A) com acentuada atividade mitótica destacada pela marcação positiva ao Ki-67 (seta, em B). (A -hematoxilina-eosina; B - imunohistoquímica para Ki-67, streptoavidina-biotina peroxidase revelado por DAB, barra = 50µm).



5.2 Quantificação da proliferação celular através da detecção do Ki-67 em glândula perianal

A detecção da marcação positiva para a proteína Ki-67 foi realizada pela observação de núcleos das células glandulares marcados em marrom pela imuno-histoquímica. Em relação ao padrão de marcação celular dos núcleos, os carcinomas apresentaram uma numerosa marcação nuclear, que foi diminuindo respectivamente nos grupos dos epitelomas, adenomas e de glândula perianal normal.

Em média, os carcinomas apresentaram maior taxa de proliferação celular (11,29%) quando comparados aos epitelomas (3,36%), aos adenomas (0,44%) e as glândulas normais (0,02%). Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) entre os carcinomas, epitelomas e adenomas (FIGURA 7).

Tomando-se os resultados do número de células Ki-67 positivas dos carcinomas, e considerando o tecido neoplásico proveniente de cães com histórico de recidiva ou não após a excisão cirúrgica, observamos que nos casos em que houve recidiva, o número de células Ki-67 positivas foi significativamente maior ($P = 0,0081$) do que nas neoplasias que não apresentaram recidiva (FIGURA 8).

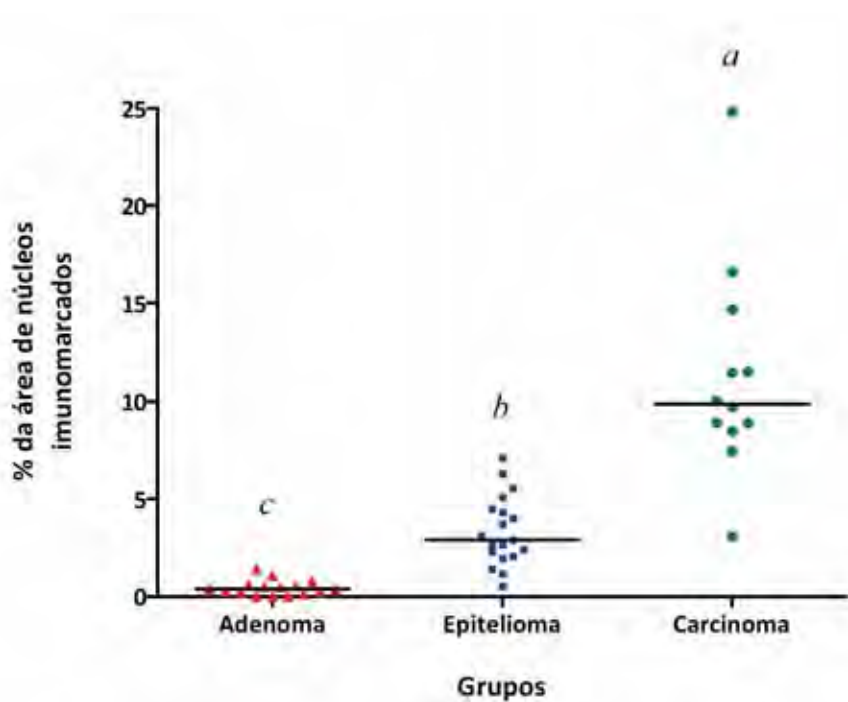


FIGURA 7. Os valores são expressos em porcentagem de área de núcleos imunomarcados em relação à área total de núcleos, avaliada colorimetricamente pelo software Image-Pro Plus 6.1. A linha horizontal representa a média. Grupos seguidos de letras distintas diferem significativamente entre si.

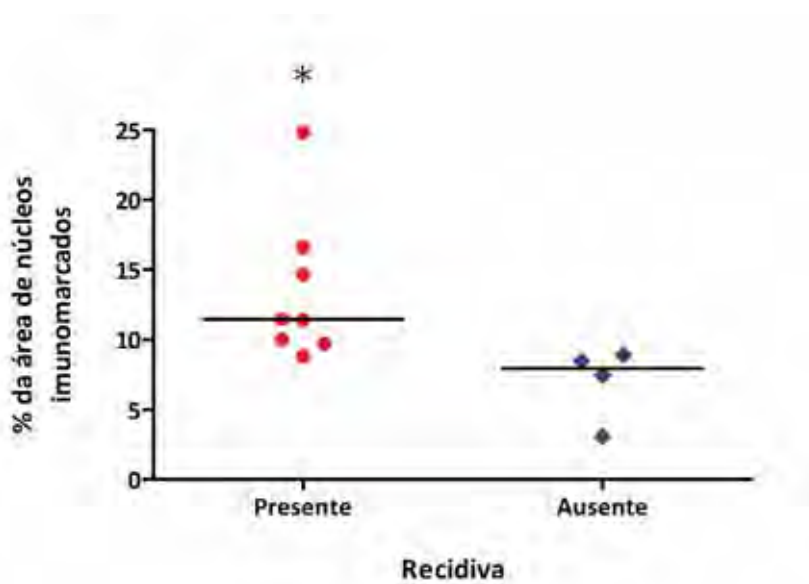


FIGURA 8. Avaliação da proteína Ki-67 em cães com carcinoma da glândula perianal, agrupados de acordo com a presença ou ausência de recidivas. Os valores são expressos em porcentagem de área de núcleos imunomarcados em relação à área total de núcleos, avaliada colorimetricamente pelo software Image-Pro Plus 6.1. A linha horizontal representa a mediana (* indica $P < 0,05$).

5.3 Informações sobre o histórico do paciente.

Dos 42 casos de neoplasias de glândulas perianais estudados, foram colhidas informações referentes ao sexo, idade, raça, histórico de outras neoplasias, histórico reprodutivo, e no caso de fêmeas, se havia relato do uso de anticoncepcional. Também foram verificadas informações sobre o tempo de evolução, ocorrência de recidiva, tempo de sobrevida e causa da morte do animal.

Constatou-se que em 34 casos (80,95%), as neoplasias foram provenientes de cães machos e 8 (19,05%) eram de fêmeas (FIGURA 9). A média de idade para o diagnóstico dos machos foi de 9 anos e 8 meses e das fêmeas 7 anos e 4 meses, sendo que considerando os dois sexos a idade variou de cinco a 15 anos (FIGURA 10).

Entre as raças onde estas neoplasias foram diagnosticadas: 26,19%(n=11) eram cães S.R.D. (sem raça definida), 21,42%(n=9) eram da raça Poodle, 9,52% (n=4) Cocker Spaniel, 9,52% (n=4) Husky Siberiano, 7,14% (n=3) Akita, 4,76% (n=2) Teckel, 4,76% (n=2) e Beagle, 2,38% (n=1). Outras raças foram observadas em menor porcentagem como: Bulldog Inglês, 2,38% (n=1) Shih Tzu, 2,38% (n=1) Maltês, 2,38% (n=1) Fox terrier, 2,38% (n=1) Lhasa Apso, 2,38% (n=1) Pointer e 2,38% (n=1) Rottweiler (FIGURA 11).

Em 23,80% (n=10) cães havia o histórico de diagnóstico de outros tipos de neoplasias.

Quanto ao histórico reprodutivo, 94,11% (n=32) dos cães machos não eram castrados, enquanto que 75% (n=6) das fêmeas eram castradas (FIGURA 12).

O tempo médio de evolução da neoplasia, segundo o relato dos proprietários, foi de 1 ano e 4 meses. E, após realizado o tratamento cirúrgico, houve relato de ocorrência de recidiva em 33,33% (n=14) (FIGURA 13).

A sobrevida em média foi de 2,3 anos, entretanto, também segundo relato dos proprietários, nenhum dos óbitos foi relacionado aos tumores das glândulas perianais.

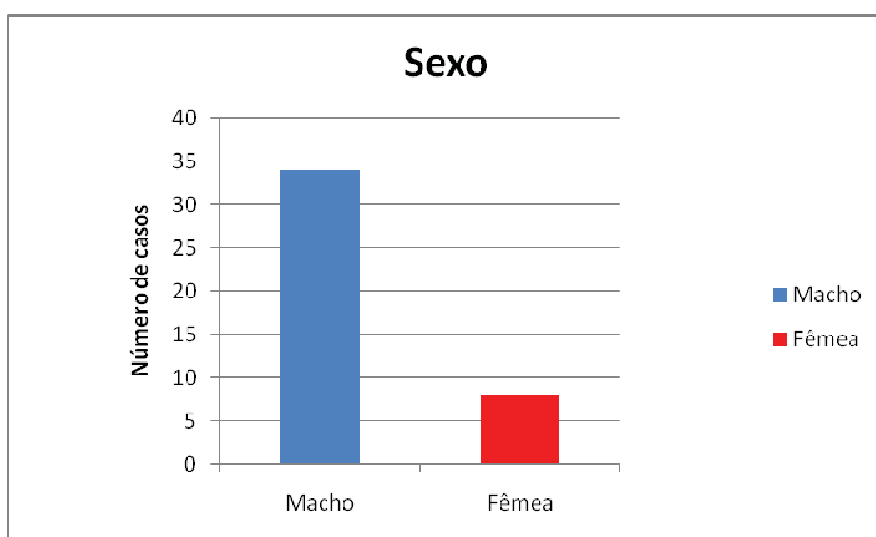


FIGURA 9: Verificação da frequência do diagnóstico das neoplasias das glândulas perianais em relação ao sexo dos animais

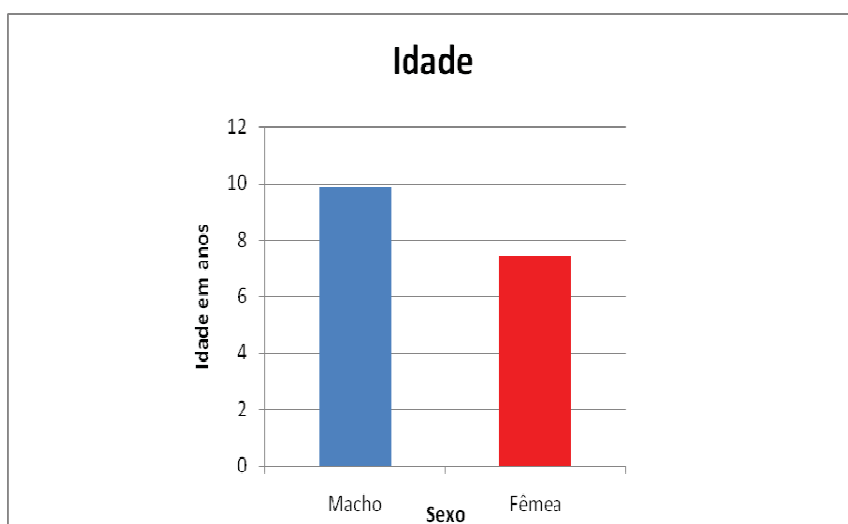


FIGURA 10: Verificação da frequência do diagnóstico das neoplasias das glândulas perianais em relação à idade dos animais

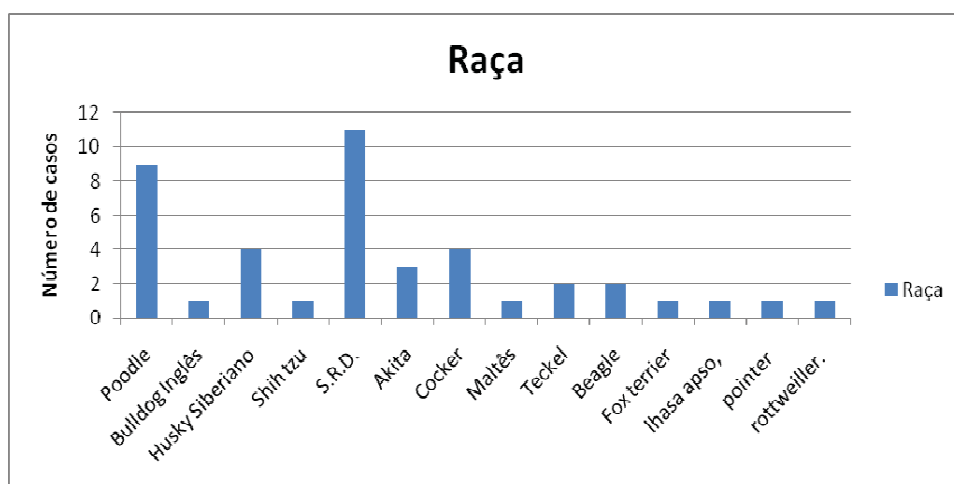


FIGURA11: Verificação da freqüência do diagnóstico das neoplasias das glândulas perianais em relação a raças dos animais

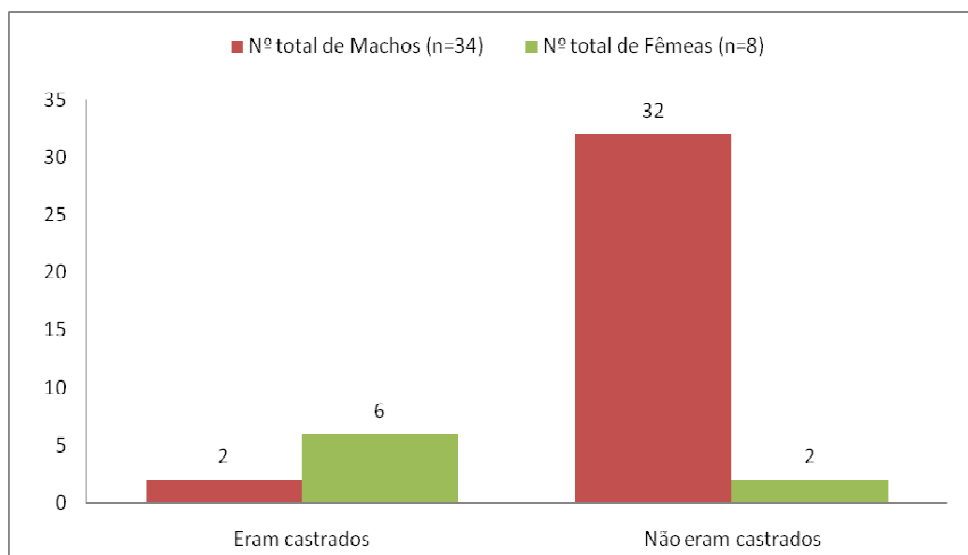


FIGURA 12: Verificação da frequência do diagnóstico das neoplasias das glândulas perianais em relação à castração e ao sexo dos animais

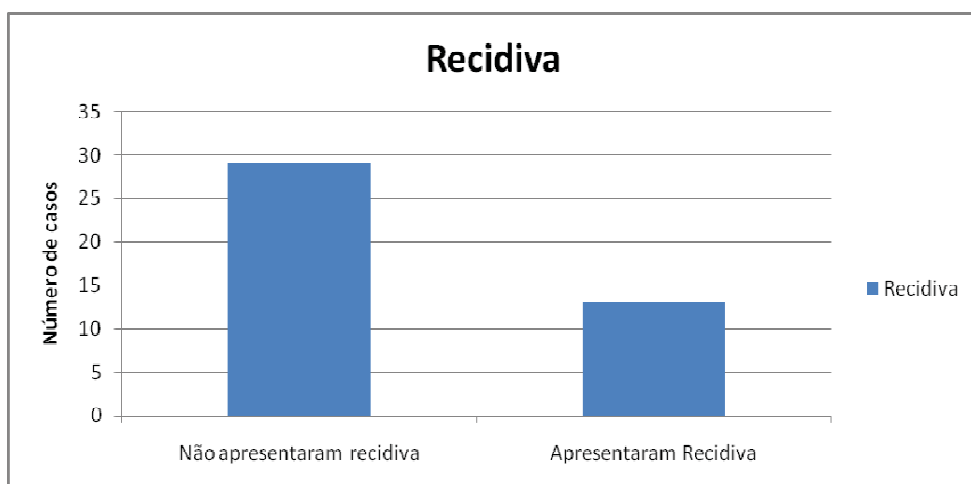


FIGURA 13: Verificação da frequência de recidiva em cães diagnosticados com carcinoma das glândulas perianais

6 DISCUSSÃO

As glândulas perianais de cães estão frequentemente sujeitas ao desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas. Este trabalho teve como objetivo determinar o padrão de expressão da proteína Ki-67 na glândula perianal normal de cães e também em neoplasias benignas e malignas, mais comuns desta glândula.

Procurou-se neste trabalho, diagnosticar com precisão as neoplasias de glândula perianal em cães, devido a complexidades anatômicas do local (GOLDSCHMIDT et al.,1998; VAIL e STEPHEN, 2001).

A marcação para a proteína Ki-67 revelou que os carcinomas apresentaram maior taxa de proliferação celular, evidenciada pelo total de núcleos com marcação positiva pela imuno-histoquímica. Assim, os carcinomas apresentaram 11,29% dos núcleos marcados/área quando comparados aos epitelomas (3,36%), aos adenomas (0,44%), e as glândulas perianais normais (0,02%). Resultados semelhantes foram descritos em outros tecidos neoplásicos (PERENTES et al.,1994), ocorrendo aumento da marcação da proteína Ki-67 de forma gradativa do tecido normal ao neoplásico benigno a ao o neoplásico maligno (PREZIOSI et al.,1995).

A ocorrência de recidiva foi relatada em 14 cães (33,33%), sendo que destes, oito apresentaram diagnóstico de carcinoma. Num estudo retrospectivo referido por GROSS et al. (2005), em 14 de 41 cães observou-se recorrência local de carcinomas perianais, não estando descrita correlação entre as recidivas e a multiplicidade das lesões, mas existindo uma correlação entre as mesmas e o avançado estado clínico da doença.

Segundo informação dos proprietários, nenhum dos casos avaliados neste estudo teve óbito devido a neoplasia das glândulas perianais ou a complicações das mesmas. Embora a informação proveniente dos proprietários não seja totalmente confiável, cabe aqui o comentário, pois, segundo a literatura neoplasias das glândulas perineais podem causar metástase e também estão relacionadas à presença de síndrome paraneoplásica

(GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005), que não foram observadas nos relatos dos prontuários dos animais neste estudo.

Quanto à predisposição racial, constatou-se que a raça mais acometida por neoplasias perianais (26,19%) foi a SRD (sem raça definida), provavelmente por ser o tipo de animal que mais frequentemente é conduzido às clínicas da região de Campinas - SP. A segunda raça mais acometida (21,42%) foi a Poodle e em terceiro lugar, em 9,52% dos casos, o Pastor Alemão e o Cocker Spaniel. Entretanto, para reconhecermos a verdadeira predisposição racial dos cães às alterações das glândulas perianais, acreditamos ser necessário um estudo mais amplo e abrangente, envolvendo outras fontes de material e um número maior de animal, pois é provável que as biópsias dos cães encaminhados ao Laboratório VETPAT sejam predominantemente da raça SRD. Como resultado da diversidade regional da predileção por raças caninas, os cães da raça Cocker Spaniel não foram associados à alta incidência destas neoplasias, como relatado previamente na literatura (GENEVOIS, 1980; BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005).

A relação observada entre a idade elevada dos animais acometidos e a maior predisposição dos machos foi confirmada pela bibliografia existente (GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005), pois a maior parte dos casos neste estudo eram de animais na faixa etária acima de oito anos e machos.

Segundo Goldschmidt e Hendrick (2002) as células das glândulas perianais têm receptores androgênicos em sua superfície e, desta forma, ocorre controle endócrino no crescimento e desenvolvimento das glândulas perianais. Estas continuam a desenvolver-se durante a vida do cão por estimulação androgênica. Assim, em machos idosos é comum ocorrer hiperplasia que, subseqüentemente, evolui para adenoma (GROSS et al., 2005).

Neste estudo observamos que 94,11% dos machos não eram castrados, semelhante ao descrito por autores como: Bennett et al. (2002); Shelly (2002); Fineman (2004); reforçando as informações da literatura de que esses tipos de tumores são hormônios dependentes. Como os carcinomas desenvolvem-se como resultado de alterações genômicas, e ao menos nos estágios iniciais da neoplasia, continuam a apresentar a dependência hormonal respondem bem à terapia de privação androgênica, ou seja, à castração (PISANI e t al., 2006).

No caso das fêmeas, onde normalmente ocorre involução das glândulas nos animais adultos, segundo Goldschmidt et al. (1998) é provável que as neoplasias estejam associadas com produção endógena de andrógeno, principalmente pela glândula adrenal. Ao contrário do que foi observado nos machos, a maioria das fêmeas deste estudo eram castradas (75%) condizendo com a literatura, onde o diagnóstico de adenomas perianais ocorrem em fêmeas, quase sempre ovariectomizadas (YAGER e WILCOCK, 1994; WITHROW, 2001; GROSS et al., 2005) e sugerindo uma possível perda da “proteção” estrogênica (WITHROW, 2001) e a ação dos andrógenos adrenais.

Embora os carcinomas perianais respondam bem à privação androgênica, muitos tumores eventualmente reagem de maneira refratária. Muitos mecanismos podem contribuir para a progressão do tumor mesmo após a ablação androgênica: mutações nos receptores androgênicos que permitem que tais receptores respondam a diferentes esteróides e mesmo antiandrógenos; as sinalizações aos receptores podem estar aumentadas por fatores de crescimento peptídicos e citocinas. Na próstata, por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e o fator de crescimento de queratinócitos são capazes de promover *in vitro* a atividade transcricional dos receptores androgênicos na ausência de andrógenos. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) também aumenta o risco de aparecimento de carcinoma prostático androgênico. Outras citocinas e fatores de ativação como a interleucina-6 e a ciclina podem ativar as vias de receptores androgênicos na ausência de andrógenos (NICKERSON et al., 1999). Por estes motivos alguns autores sugerem que os andrógenos possam agir como promotores tumorais,

via estimulação androgênica, nas glândulas perianais, levando a um aumento da proliferação celular e decréscimo da apoptose, à semelhança do que ocorre na carcinogênese prostática, túbulos seminíferos e outros tecidos andrógenos dependentes (CHODAK et al.,1992; ERKKILA et al.,1997; SIMPSON et al.,1999; BENNET et al., 2002).

Apenas 10 cães (23,80%) apresentaram em seus prontuários o histórico de outras neoplasias. Segundo Wilson e Hayes, (1979) e HEDLUND, (1997), cães portadores de adenomas perianais muitas vezes apresentam simultaneamente tumores testiculares de células intersticiais, mas entre as outras neoplasias relatadas nenhuma era relacionada a este tipo de tumor. Apesar do tratamento preconizado aos machos incluir a remoção dos testículos, os mesmos não foram submetidos à avaliação histopatológica para verificar existência ou não de neoplasias, portanto não foi possível realizar estudos sobre esta correlação.

O tempo de evolução da neoplasia segundo relatos dos proprietários foi em média de 12 meses, sendo considerado um tempo de evolução prolongado, se levado em consideração que, em machos idosos é comum ocorrer hiperplasia que, subseqüentemente, evolui para adenoma (GOLDSCHMIDT e SHOFER, 1992; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005). Como os índices proliferativos elevados, verificados pela aplicação do anticorpo anti-Ki-67, estão associados a um comportamento clinicopatológico maligno e a um pior prognóstico de vários tumores nos animais domésticos (GRIFFEY et al., 1999; ROELS et al., 1999; GERALDES et al., 2000; ROELS et al., 2000), este marcador demonstra relação com o grau da malignidade da neoplasia. Uma vez que neste estudo houve diferença significativa no número de células marcadas para o Ki-67 entre as diferentes neoplasias estudadas, o marcador mostrou-se efetivo para a classificação das neoplasias benignas e malignas das glândulas perianais.

A avaliação histológica de rotina das neoplasias da glândula perianal, com os cortes corados pela hematoxilina-eosina permite um diagnóstico e classificação bastante acurado dos adenomas, epitelomas e carcinomas,

sendo importante a verificação do padrão morfológico predominante para a conclusão do diagnóstico. Entretanto, observamos, particularmente nos epitelomas, áreas com maior anaplasia, sugerindo transição para um grau maior de malignidade. Nestes casos, a marcação para a Ki-67 pode servir de ferramenta auxiliar para o diagnóstico, uma vez que sinaliza melhor uma das alterações nucleares que caracterizam a malignidade (ex. proliferação celular).

Ainda no caso dos carcinomas, a observação do número elevado de núcleos positivos para o Ki-67 apresentou boa relação com a maior recidiva do tumor, conforme descrito por Valente (1994) para os carcinomas glandulares. Então, embora não tenham sido feitas análises específicas sobre o comprometimento ou não das margens cirúrgicas após a excisão terapêutica, este marcador pode ser considerado um indicador de prognóstico de recidivas para os carcinomas de glândulas perianais.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, a determinação dos índices proliferativos através da avaliação da imunoreactividade ao anticorpo anti-Ki-67, revelou-se uma importante ferramenta de auxílio para a diferenciação entre adenomas, epitelomas e carcinomas das glândulas perianais de cães.

Embora a coloração pela HE permita uma boa diferenciação morfológica das neoplasias supracitadas, a marcação para a Ki-67 pode servir de ferramenta auxiliar para o diagnóstico, uma vez que sinaliza melhor uma das alterações celulares que caracterizam a malignidade: altos níveis de proliferação celular.

No caso dos carcinomas, houve diferença significativa no número de núcleos positivos para o Ki-67, quando comparados quanto a presença ou não de recidiva da neoplasia. Portanto este marcador poderá ser considerado um indicador prognóstico de recidiva para os carcinomas de glândulas perianais.

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, V. J.; EVANS, M. K.; SAMPSON, J.; WOOD, N. L. J. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, p.512-524, 2010.

BERROCAL, A.; VOS, J. H.; VAN DEN INGH, T. S.; MOLENBEEK, R. F.; VAN SLUIJS, F. J. Canine perineal tumours. **Zentralbl Veterinarmed A.**, v. 36, n. 10, p. 739-749, 1989.

BLAZQUEZ, N. B.; FRENCH, J. M.; LONG, S. E.; PERRY, G. C. A pheromonal function for the perineal skin glands in the cow. **Vet Rec.**, v. 123, n. 2, p. 49-50, 1988.

BOUZUBAR, N.; WALKER, K. J.; GRIFFITHS, K.; ELLIS, I. O.; ELSTON, C. W.; ROBERTSON, J. F.; BLAMEY, R. W.; NICHOLSON, R. I. Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. **Br J Cancer**. 1989 Jun;59(6):943-7

BRAGULLA, H. et al. Tegumento comum. In: KÖNIG, H. E. & LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre : ARTMED, 2004. p. 325-378

BRODEY, R. S. **Canine and Feline Neoplasia**. Adv. Vet. Sci, 1970. 1v.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammarygland neoplasms. **J Am Anim Hosp Assoc** 1983;19:61-90.

BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cell. **Cell Prolif**, v. 25, n. 1, p. 31-40, 1992.

BURROWS, C. F.; ELLISON G. V. Moléstias anorretais. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 3. ed. São Paulo : Manole, 1992. v. 3, p. 1632-1648.

CHODAK, G. W. ; KRANC, D. M. ; PUY, L. A. ; TAKEDA, H.; JOHNSON, K.; CHANG, C. Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. **J. Urol.**, v. 147, n.3, p. 798-803, 1992.

COOPER, M. P.; BRAAKHUIS, B. J. M.; de VRIES, N.; Van DONGEN, GAMS, NAUTA, J. J. P.; SNOW, G. B.; A painel of biomarkers of carcinomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as potential intermediate andpoints in chemopreventions trials. **Cancer Journal** 1993; 71:825-30.

ERKKILA, K.; HENR IKSÉN, K.; HIRVONEN, V.; RANNIKKO, S.; SALO, J.; PARVINEN M.; DUNKEL, L. Testosterone Regulates Apoptosis in Adult Human Seminiferous Tubules in Vitro. **J. Clin. Endocr. & Metab.**, v. 82, n. 7, p. 2314-2321, 1997.

ESPLIN, D. G.; WILSON, S. R.; HULLINGER, G. A. Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs. **Vet Pathol.**,v. 40, n. 3, p.332-334, 2003.

EVANS, H. E.; HOWARD, E. E.; SUSAN, A. In: Evans H. E. Miller's **anatomy of the dog**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1993.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, C. M.; BRUM, S. J.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense. In: *Pesq. Vet. Bras.*, 28., 2002. **Proceedings Santa Maria**, 2008. p. 223-230.

FINEMAN, L. S. Tumores da pele e do tecido subcutâneo em cães e gatos. In: ROSENTHAL, R. C. **Segredos em oncologia veterinária**. Porto Alegre : Artmed, 2004. p. 169-176.

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

GENEVOIS, J. P. Pathologie ano retale e perineale .I.Circumnalomes. Revue.Med.Vet., v. 131, p. 697-705, 1980. BENNETT, P. F.; DENICOLA, D. B.; BONNEY, P.; GLICKMAN, N. W.; KNAPP, D. W. Canine anal sac adenocarcinomas: clinical presentation and response to therapy. **J Vet Intern Med.**, v. 16, n. 1, p. 100-104, 2002.

GERALDES M, GÄRTNER F, SCHMITT F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **The Veterinary Record** 2000; 146 (14): 403-406. Acessado em 12 jan. 2011.

GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer** 1983; 31 (1): 13-20.

GERDES, J., BECKER, M. H. G., KEY, G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely tissues. **J Pathol.**, v. 168, n. 1, p. 85-7, 1992.

GERDES, J.; SCHLUETER, C. L. L.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRM, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell

proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol** 1991; 238:867-73.

GIANNONI, C.; EI NAGGAR, E. K.; ORDONEZ, N. G.; AUSTIN, J.; LUNA, M. A.; BAAKIS, J. G. C-erbB-2/neu oncogene and Ki-67 analysis in the assessment of palatal salivary gland neoplasms. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 112:391-8.

GOLDSCHMIDT, M. H. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of skin of domestic animals. Washington, **Armed Forces, Institute of Pathology**, 1998, v. 3, p. (second series).

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Ames : Iowa State, 2002. p. 44 - 117.

GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. Skin tumors of the dog and cat. **Oxford: Pergamon**, 1992. 316 p.

GOLDSCHMIDT, M. H.; ZOLTOWSKI, C. Anal sac gland adenocarcinoma in the dog: 14 cases. **J Small Anim Pract.**, v. 22, n. 3, p. 119-128, 1981.

GOURLEY, I. M.; GREGORY, C. R. Atlas of small animal surgery. Philadelphia: **J.B. Lippincott**, 1992. , cap 15, p.155-156.

GRIFFEY, S. M.; KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Proliferation Indices in Spontaneous Canine Lung Cancer: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and Mitotic Counts. **Journal of Comparative Pathology** 1999; 120 (4): 321-332.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J. & WALDER, E. J. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease. **Veterinary dermatopathology** St. Louis: Mosby, 1992. 2v.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J. & WALDER, E. J. **Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. St. Louis : Mosby, 1992. 520p.

GROSS, T. L.; IHRKE, P.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Epithelial Neoplasms and other Tumors. Epithelial Neoplasms and other Tumors. Sebaceous Tumors. Sweat Gland Tumors. In: Skin diseases of the Dog and Cat. **Clinical and Histopathologic Diagnosis**, 2nd ed., p. 641-689. Blackwell Publishing, Oxford, 2005.

HARGIS, A. M. Sistema tegumentar. In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. Porto Alegre : ARTMED, 1998. p. 486-540. 2 v.

HEIDEBRECHT, HJ; BUCK, F; HAAS, K; WACKER, HH; PARWARESCH, R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yeld new data on the Ki-67 proteins. **Cell Prolif**, 29 (7):413-25, 1996.

HOLT P. **Anal and perianal surgery in dogs and cats**. In Pract., v. 7, n. 3, p. 82-89, 1985.

JONES, T. C.; HUNT, R. D. & KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p. 6 v.

KIUEP, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Vet. Pathol.**, v. 36, p. 292-300, 1999.

KRITPRACHA, K.; HANPRASERTPONG, J.; CHANDEYING, V.; DECHSUKHUM, C.; GEATER, A. A survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to Referências Bibliográficas 64 proliferative index of MIB-1 immunostaining. **J Obstet Gynaecol Res** 2005; 31:268-76.

LAZZARO, B.; CLEVELAND, D. P53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. **Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2000; 89:613-7.

MADEWELL, B. R. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 15, p. 334-340, 2001.

MCKEEVER, P. E.; STRAWDERMAN, M. S.; YAMINI, B.; MIKHAIL, A. A.; BLAIVAS, M. MIB-1 proliferation index predicts survival among with grau II astrocytoma. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v.57, p. 931-936, 1998.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais – Atlas colorido e guia terapêutico**. São Paulo: Roca, p. 353, 2003. 2 v.

MEUTEN, D. J.; SEGRE, G. V.; CAPEN, C. C.; KOCIBA ,G. J.; VOELKEL, E. F.; LEVINE, L.; TASHJIAN, A. H.; CHEW, D. J., NAGODE, L Hypercalcemia in dogs with adenocarcinoma derived from apocrine glands of anal sac. **Lab. Inves.**, v. 48, n. 4, p. 428-435, 1983.

MURAKAMI, M.; OHTANI, I.; HOJO, H.; WAKASA, H. Immunohistochemical evaluation with Ki-67: na application to salivary gland tumours. **J Laryngol Otol** 1992; 106:35-8.

NICKERSON, T.; MIYAKE, H.; GLEAVE, M. E.; POLLAK, M. Castration-induced apoptosis of androgen-dependent shionogi carcinoma is associated

with increased expression of genes encoding insulin-like growth factor-binding proteins. **Cancer Res.**, v. 59, n.14, p. 3392-3395, 1999.

NIELSEN, S. W.; ATTOSMIS, J. Canine perianal gland tumors. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 144, p.127-135, 1964.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Rev Port Ciênc Vet** 1994; 89(509):10-29.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **J Vet Diagn Invest** 1998;10(3):237-46.

PERENTES, E.; ARNOLD, J.; MEIER, G.; ETTLIN, R. A.; KARAMITOPOULOU, E.; PRENTICE, D. E. Proliferating cell nuclear antigen expression in Wistar rat livers. A retrospective immunohistochemical study of normal and neoplastic livers. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 46, n. 2, p. 105- 110, 1994 .

PISANI, G.; MILLANTA, F.; LORENZI, D.; VANNOZZI, I.; POLI A. Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. **Res Vet Sci.**, v. 18, 2006.

PREZIOSI, R.; DELLA SALDA L.; RICCI, P., SIMONI P., MARCATO P. S. Quantification of nuclear organiser regions in canine perianal gland tumours. **Res Vet Scie**, v. 58, n. 4, p 277-281, 1995.

PRIESTER, W. A. The occurrence of tumors in domestic animals. National Câncer Institute Monograph. Maryland: **NIH Publication**, 1980, p.158.

PULLEY, L. T.; STANNARD, A. A. Tumors of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. Berkeley: University of California, 1990, 3v, p. 23-87.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 Proliferation Markers as Criteria for Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 1, p. 13-24. , 1999.

ROELS, S.; TILMANT, K.; VAN DAELE, A.; VAN MARCK, E.; DUCATELLE, R. Proliferation, DNA Ploidy, p53 Overexpression and Nuclear DNA Fragmentation in Six Equine Melanocytic Tumours. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 47. p. 439-448. 2000.

ROSSETTO, V. J. V. ; MORENO, K.; GROTTI, B. C.; REIS, R. C.; BRACARENSE, L. R. F. P. A. Frequência de neoplasma em cães diagnosticados por exame citológico: estudo retrospectivo em um hospital-escola. **Ciências Agrárias**, V. 30, p. 189-200, 2009.

SASAKI K, MURAKAMI T, KAWASAKI M, TAKAHASHI M. The cell cycle associated a change of the Ki-67 nuclear antigen expression. **J Cell Physiol** 1987; 133:579-84.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell Physiol** 2000;182:311-322.

SCOTT, D. W. et al. **Dermatologia dos pequenos animais**. Philadelphia : Saunders Company, 2001. 6 v.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. Once more about hepatoid circumanal glands of dogs. History of their discovery and reasons for revision the structural and functional data. **Izv Akad Nauk Ser Biol.**, v.2, p. 176-185, 2002.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. The sex dimorphism of the hepatoid circumanal glands in the dog and the dynamics of its development. **Izv Akad Nauk Ser Biol.**, v.5, p.590-605, 1995.

SHELLEY, B. A. Use of the carbon dioxide laser for perianal and rectal surgery. **Vet Clin North Am Small Anim Pract.**, v. 32, n. 3, p. 621-637, 2002.

SIMPSON, E.; RUBIN, G.; CLYNE, C.; ROBERTSON, K.; O'DONNELL, L.; DAVIS, L. S. ; JONES, M. Local estrogen biosynthesis in males and females. **Endocr Relat Cancer**, v. 6, n. 2, p. 131-137, 1999.

VAIL, D. M. & WITHROW, S. J. **Tumors of the skin and subcutaneous tissues**. In: WITHROW, S. J. & MACEWEN, E. G. Small animal clinical oncology. 3. ed. Philadelphia : Saunders Company, 2001. p. 233-260.

VALENTE, G.; ORECCHIA, R.; GANDOLFO, S.; ARAUDO, M.; RAGONA, R.; KERIN, S.; PALESTRO, G. Na Ki-67 immunostaining predict response to radiotherapy in oral squamous cell carcinoma? **J Clin Pathol** 1994, 47:109-12.

VARGAS, H.; SUDILOVSKY, D.; KAPLAN, M. J.; REGEZI, J. A.; WEIDNER, N. Mixed tumor, polymorphous low grade adenocarcinoma and Adenoid Cystic Carcinoma of the salivary gland. Pathogenic implications and differential diagnose by Ki-67 (MIB1), Bcl1, and S-100 imunohistochemistry. **App Imunohistoch** 1997, 5:8-16.

VASCELLARI, M.; BAIONI, E.; RU, g.; CARMINATO, A.; MUTINELLI, F.; Animal tumor registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. **BMG Veterinary Research**, v.5, p. 1-9, 2009.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R. G. **Atlas colorido de dermatologia dos pequenos animais: guia para o diagnóstico**. São Paulo : Manole, 1996. v. 2

WILSON, G. P.; HAYES JR, H. M. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 174, n.12, p. 1301-1303, 1979.

WITHROW, S. J. Perianal tumors. In: WITHROW, S. J. & MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 3. ed. Philadelphia : Saunders Company, 2001. p. 346-353.

YAGER, J. A.; WILCOCK, B. P. **Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors**. London : Wolfe, 1994. v. 1

ZUCCARI, D. A. P. C. **Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas**. 1999. 122p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal.

ANEXO

Tabela A: Dados apresentados como sexo, idade, raça, presença de outras neoplasias, castração, tempo de evolução, recidiva e sobrevida dos 42 animais estudados no trabalho.

| Nº | Sexo | Idade | Raça | Outras Neoplasias | Castrado | Tempo de Evolução | Recidiva | Sobrevida |
|----|-------|---------|-----------------|------------------------------|----------|-------------------|----------|----------------------------|
| 1 | Macho | 8 anos | Poodle | | Não | 1,5 Ano | Não | Esta vivo |
| 2 | Macho | 9 anos | Bulldog Inglês | Adenoma de Glândula Apócrina | Não | 2 Anos | Não | Insuficiência Renal (2008) |
| 3 | Fêmea | 12 anos | Poodle | | Não | 2 Anos | Não | Cardiopatia (2010) |
| 4 | Macho | 11 anos | Poodle | Epitelioma Glândula meibomio | Não | 1 Ano | Não | Óbito 2010 |
| 5 | Macho | 8 anos | Husky Siberiano | Carcinoma espinocelular | Não | 1 Ano | Não | Óbito 2005 |
| 6 | Fêmea | 7 anos | Shitzu | | Sim | 1 Ano | Sim | Elichiose (2010) |
| 7 | Macho | 9 anos | S.R.D. | Lifoma | Não | 2 Anos | Não | Óbito 2010 |
| 8 | Fêmea | 8 anos | Cocker | | Sim | +/- 8 meses | Não | Esta viva |
| 9 | Macho | 9 anos | Husky Siberiano | | Não | +/- 9 meses | Sim | Esta vivo |

| | | | | | | | | |
|----|-------|---------|-----------------|----------------------------|-----|----------|-----|----------------------------|
| 10 | Macho | 10 anos | Husky Siberiano | Mastocitoma | Não | 10 meses | Não | Óbito 2010 |
| 11 | Macho | 9 anos | Poodle | | Não | 1 Ano | Não | Esta viva |
| 12 | Macho | 11 anos | S.R.D. | | Não | 2 Anos | Não | Óbito 2010 |
| 13 | Macho | 7 anos | Akita | Melanoma | Não | 2 Anos | Não | Morreu em 2009 |
| 14 | Macho | 13 anos | Poodle | | Não | 1 Ano | Não | Morreu em (2009) |
| 15 | Fêmea | 5 anos | Maltês | | Sim | 2 A | Sim | Esta vivo |
| 16 | Macho | 10 anos | S.R.D. | | Não | 1Ano | Não | Atropelado (2008) |
| 17 | Macho | 8 anos | Akita | | Não | 2 Anos | Sim | Intoxicado (2009) |
| 18 | Macho | 13 anos | Teckel | | Não | 1 Ano | Não | Cardiopatia (2007) |
| 19 | Macho | 15 anos | Beagle | | Não | 6 meses | Não | Insuficiência Renal (2007) |
| 20 | Fêmea | 8 anos | S.R.D. | | Não | 2 Anos | Não | Esta vivo |
| 21 | Macho | 11 anos | Beagle | Tumor de células de Leydig | Não | 1 Ano | Sim | Cardiopatia (2009) |

| | | | | | | | | |
|----|-------|---------|----------------|-----------------------------|-----|--------------|-----|----------------------------|
| 22 | Macho | 13 anos | Cocker | | Sim | 2 Anos | Não | Velhice (2008) |
| 23 | Macho | 10 anos | Lhasa Apso | | Não | 1 Ano | Não | Insuf.Respiratória (2009) |
| 24 | Macho | 11 anos | Poodle | | Não | 1 Ano | Não | Velhice (2009) |
| 25 | Macho | 13 anos | Pointer | Carcinoma Broncoalveolar | Não | 2 Anos | Não | Óbito 2008 |
| 26 | Macho | 10 anos | Poodle | | Não | 3 Anos | Não | Velhice (2008) |
| 27 | Macho | 10 anos | S.R.D. | | Sim | +/- 10 meses | Não | Esta vivo |
| 28 | Macho | 11 anos | S.R.D. | | Não | 1 Ano | Não | Insuficiência Renal (2009) |
| 29 | Macho | 10 anos | Rottweiler | Adenoma de Glândula Sebácea | Não | 2 Anos | Sim | Cardiopatia (2008) |
| 30 | Macho | 10 anos | S.R.D. | | Não | +/- 8 meses | Não | Atropelado (2009) |
| 31 | Macho | 5 anos | Poodle | | Não | 6 meses | Sim | Esta vivo |
| 32 | Macho | 11 anos | S.R.D. | | Não | 5 meses | Sim | Insuficiência Renal (2009) |
| 33 | Fêmea | 8 anos | Cocker Spaniel | | Sim | 1 Ano | Sim | Cardiopatia (2009) |
| 34 | Macho | 10 anos | Husky | | Não | 1 Ano | Sim | |

| | | | Siberiano | | | | | Hiperadrenocorticism 2009 |
|----|-------|---------|----------------|---------------------------------|-----|-------------|-----|-----------------------------|
| 35 | Fêmea | 3 anos | S.R.D. | Cisto Apócrino | Sim | +/- 4 meses | Sim | Esta viva |
| 36 | Macho | 6 anos | Poodle | Hiperplasia de Glândula sebácea | Não | +/- 9 meses | Não | Esta vivo |
| 37 | Macho | 10 anos | Akita | | Não | +/- 7 meses | Sim | Atropelado (2007) |
| 38 | Macho | 8 anos | S.R.D. | | Não | 1 Ano | Não | Mordido por Pit-bull (2009) |
| 39 | Macho | 12 anos | Teckel | | Não | 2 Anos | Sim | Cardiopatia (2007) |
| 40 | Fêmea | 8 anos | Cocker Spaniel | | Sim | 1 Ano | Não | Esta viva |
| 41 | Macho | 11 anos | Fox Terrier | | Não | 1 Ano | Não | Não sabe informar |
| 42 | Macho | 10 anos | S.R.D. | Epitelioma de Glândula Sebácea | Não | 1 Ano | Sim | Óbito em 2007, |