

Graduación nuclear y determinación de regiones organizadoras de nucléolos en muestras citológicas de tumores mamarios caninos

Rosciani, A.S.¹; Merlo, W.A.¹; Guaimás Moya, L.E.²;
Báez, A.²; López, J.E.²; Macció, O.A.¹

¹ Servicio de Diagnóstico Histopatológico y Citológico,

² Hospital de Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax 03783-425753. Email: histopat@vet.unne.edu.ar

Resumen

Rosciani, A.S.; Merlo, W.A.; Guaimás Moya, L.E.; Báez, A.; López, J.E.; Macció, O.A.: Graduación nuclear y determinación de regiones organizadoras de nucléolos en muestras citológicas de tumores mamarios caninos. *Rev. vet.* 16: 2, 65-68, 2005. Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en las hembras caninas y aproximadamente el 50% son malignos. Su comportamiento biológico es variable y difícil de predecir. La presente comunicación tiene como objetivo reafirmar la posibilidad de realizar tipificación de muestras citológicas de tumores mamarios mediante la determinación de grado nuclear y de marcadores de regiones organizadoras de nucléolos (AgNOR). Para ello fueron analizados 45 tumores mamarios, hallándose un 9% de neoplasias benignas y una relación clara entre los citodiagnósticos de neoplasias malignas y las determinaciones de grado nuclear y AgNOR.

Palabras clave: perro, neoplasia mamaria, citodiagnóstico, grado nuclear, AgNOR.

Abstract

Rosciani, A.S.; Merlo, W.A.; Guaimás Moya, L.E.; Báez, A.; López, J.E.; Macció, O.A.: Nuclear grade and nucleolus organizing regions determination in canine mammary tumor cytological samples. *Rev. vet.* 16: 2, 65-68, 2005. Mammary tumors are the most frequent neoplasms in bitches; about 50% of them are malignant. Its biological behavior is difficult to predict. This communication aims to reaffirm cytological classification possibilities by means of nuclear grade and nucleolar organizing region marker (AgNOR) determinations. For this reason, 45 canine mammary tumors were analyzed, finding only 9% of benign neoplasms. There is a clear relationship between malignant neoplasms cytodiagnostic and nuclear grade and AgNOR determinations.

Key words: dog, mammary tumors, cytodiagnostic, nuclear grade, AgNOR count.

INTRODUCCION

Los tumores mamarios son las neoplasias más frecuentes en las hembras caninas y aproximadamente el 50% de ellos son malignos⁶. Se manifiestan habitualmente como nódulos únicos o múltiples, en una o en más glándulas, pudiendo pertenecer al mismo o a diferentes tipos morfológicos, presentando estructura y comportamiento biológico variables¹⁹. Raramente ocurren en hembras caninas menores de 2 años, pero a partir de los 6-7 años de edad su incidencia se incrementa considerablemente. Los machos son infrecuentemente afectados, en la mayoría de los casos por formas malignas²⁰. El tiempo de supervivencia de los pacientes tratados por tumores malignos es significativamente menor (4 a 17 meses) que el de los tratados por tumores benignos¹⁹.

Los tumores mamarios caninos históricamente se han agrupado de acuerdo a criterios histogénicos, mor-

fológicos, descriptivos y pronósticos, resultando en clasificaciones innecesariamente complejas y de difícil aplicación. La clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud (1999) se ha simplificado y relaciona los diferentes tipos histológicos con el grado de malignidad.

Se han realizado diversos trabajos en busca de indicadores objetivos del comportamiento biológico tumoral, considerándose como tales: tipo histológico, forma de crecimiento, estadificación clínica, tamaño, grado de diferenciación nuclear, ploidía¹⁴, índice mitótico y angiogénesis tumoral^{12, 21}. Se han establecido diferentes pruebas estadísticas multivariadas para la identificación de factores independientes, siendo el tipo histológico del blastoma, uno de los más destacados. Estas determinaciones confirmaron una relación directa entre el alto grado de anaplasia y el pronóstico desfavorable. De todas maneras, a pesar de la identificación de estos factores, el comportamiento biológico de los tumores mamarios caninos, es aún difícil de predecir. Por ello,

es imprescindible la identificación de otras herramientas que permitan reconocer pacientes con alto riesgo de recurrencia y muerte¹⁸.

De acuerdo a algunos autores, el examen histopatológico constituye el método diagnóstico más confiable, ya que permite además de la tipificación y graduación, la valoración de factores como infiltración vascular, cutánea y de tejidos blandos. Además, brinda datos como grado de diferenciación, índice mitótico, necrosis y compromiso de los bordes de la pieza quirúrgica¹⁹.

Algunos especialistas consideran que el citodiagnóstico es inadecuado para diferenciar entre lesiones benignas y malignas en glándula mamaria canina¹⁹. Sin embargo, varios trabajos demostraron la notable correspondencia existente entre los resultados de los análisis citopatológico e histopatológico, resaltando la confiabilidad del primero y su utilidad como método complementario^{7, 9, 13, 26}. Otros investigadores confirmaron sus cualidades mediante la observación del comportamiento evolutivo de las lesiones diagnosticadas^{28, 29}. Para las patologías mamarias se ha establecido un sistema de diferenciación de tumores benignos de malignos² y se han clasificado citológicamente, presentándose una tipificación de los tumores mamarios¹⁷. Algunos autores otorgan valor pronóstico a la determinación del diámetro nuclear en las muestras citológicas de carcinomas mamarios³⁰.

En medicina humana la graduación histopatológica tumoral es considerada como un importante indicador pronóstico, aunque no se incluye como parámetro en la estadificación de las neoplasias²⁵. A lo largo de los años, diversos autores propusieron distintos sistemas de graduación, entre ellos un sistema de *scores* basado en la formación de túbulos, pleomorfismo nuclear, hiperromasia y actividad mitótica³. Se realizaron diversos intentos para tornar este sistema más objetivo, hasta que en 1993 se propone¹¹ una versión modificada del método clásico precitado³. En medicina veterinaria se encuentran escasos trabajos que apliquen graduaciones histopatológicas estandarizadas²³; en general, cada investigador utiliza distintos sistemas, lo que no permite comparar resultados entre una serie de tumores y otra.

Las regiones organizadoras de nucléolos (NORs) son segmentos de los cromosomas que contienen genes ribosomales. Estos segmentos se hallan relacionados a proteínas no histónicas, ácidas (AgNORs), evidenciables por medio de impregnación argéntica como puntos negros en las muestras cito e histopatológicas¹⁵. En los últimos tiempos esta técnica ha despertado interés creciente en medicina veterinaria debido a su simplicidad y bajo costo, como así también por ser considerada como método válido en la emisión de pronósticos en lesiones neoplásicas, debido a su capacidad de mostrar el estado de proliferación de las células tumorales^{10, 18}. Específicamente su aplicación en neoplasias de glándula mamaria en perras mostró diferencias entre tumores benignos y malignos¹⁶. En otros casos se halló correlación entre el tipo histopatológico, la determinación de AgNORs como pronóstico y la ocurrencia de muerte relacionada

con la neoplasia mamaria dentro del año post-cirugía^{4, 5}. Su difusión entre los patólogos ha sido muy amplia y ha generado reportes escasamente comparables entre sí. Esta divergencia se debe a diferencias en la técnica de impregnación y al procedimiento utilizado para cuantificar e interpretar las AgNOR²⁷.

El presente estudio tuvo por objetivo constatar la eficacia de las técnicas de determinación del grado nuclear y marcación de AgNOR en la tipificación de tumores mamarios a partir de muestras citológicas de caninos. El trabajo forma parte de un proyecto amplio que investiga distintos indicadores pronósticos del comportamiento biológico de las neoplasias mamarias caninas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fueron analizados 45 tumores correspondientes a 32 hembras caninas (15% castradas) cuyas edades oscilaron entre los 5 y 16 años. Los animales provenían del Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE) y de diversas clínicas privadas de la región. El 65 % de los pacientes fue de raza indefinida; los restantes fueron de razas puras, hallándose una mayor incidencia en la raza Cocker. La presentación más frecuente fue la de tumores múltiples (72%), predominando en los dos últimos pares de mamas (64%).

Para la realización del citodiagnóstico se tomaron muestras por punción con aguja fina de los diferentes tumores mamarios presentados por cada paciente. Tal metodología constituye una variante de la punción-aspiración^{1, 8, 22} y es útil para obtener muestras de distintos tipos de lesiones. Para su realización se emplearon agujas descartables de 40x8. Los especímenes fueron fijados en alcohol de 96° y coloreados con Wright y con la técnica de Hematoxilina y Eosina. Se reservaron 2 vidrios para la determinación de AgNOR. La tipificación del tumor se realizó de acuerdo a la Clasificación Histopatológica de la OMS (1999).

Se determinó el grado nuclear, de acuerdo al ítem correspondiente a “pleomorfismo nuclear” del método de graduación de tumores de Elston & Ellis¹¹, estableciéndose las categorías I (núcleos pequeños, regulares y con leve variación), II (moderada variación en el tamaño y forma nuclear; ocasionales nucléolos) y III (marcada variación en el tamaño nuclear, núcleos bizarros y frecuentes nucléolos prominentes).

Para la determinación de las regiones organizadoras de nucléolos (AgNOR) se utilizó la Técnica de Howell y Black (1980) para muestras citológicas¹⁵. Sobre un portaobjetos con el material fijado, se colocó una gota de solución acuosa de gelatina al 2% (con ácido fórmico al 1%). Tras adicionar a la gota anterior, 2 gotas de solución acuosa de nitrato de plata al 50%, se cubrió con un cubreobjetos y se incubó en estufa a 60°C por un período de 10 minutos aproximadamente, hasta que la lámina adquirió una coloración marrón dorada. Se retiró de la estufa y se lavó con agua destilada, realizándose finalmente una coloración de contraste con Giemsa al 1%. Como método de cuantificación se utilizó el recuento a

máximo aumento (1000 X) de puntos nucleares impregnados con plata, por núcleo, expresándose el promedio de los recuentos realizados por dos operadores.

Estadísticamente se efectuaron cálculos de tendencia central y dispersión (media aritmética y desvío estándar) y se realizó análisis de la varianza de los resultados obtenidos de la marcación de AgNOR/núcleo entre los distintos tipos tumorales. Se buscaron diferencias significativas entre medias utilizando el test de Tuckey ($p < 0,05$)²⁴.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan los distintos tipos tumorales hallados, diagnosticados por citología de acuerdo a la Clasificación Histopatológica de la OMS (1999). Los mismos se presentan de acuerdo a un orden creciente de malignidad.

En esta serie se encontraron 4 neoplasias benignas (9%) y los casos restantes (91%) correspondieron a variedades malignas, como las que se muestran en las Figuras 1 y 2.

Los resultados de graduación nuclear y cuantificación de AgNOR en los distintos tipos de neoplasias malignas estudiadas, se muestran respectivamente en Tablas 2 y 3.

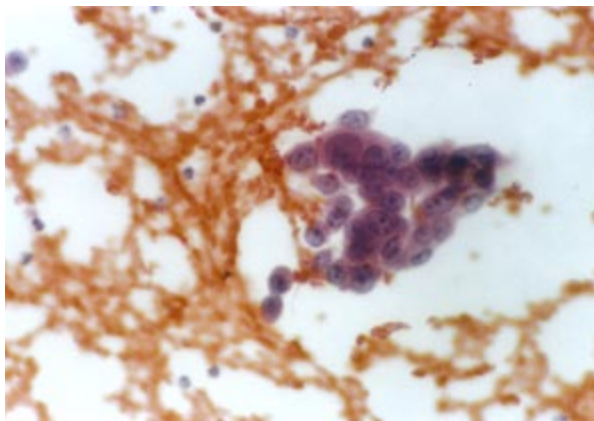


Figura 1. Carcinoma anaplásico, células grado nuclear III. H y E, 250 X.

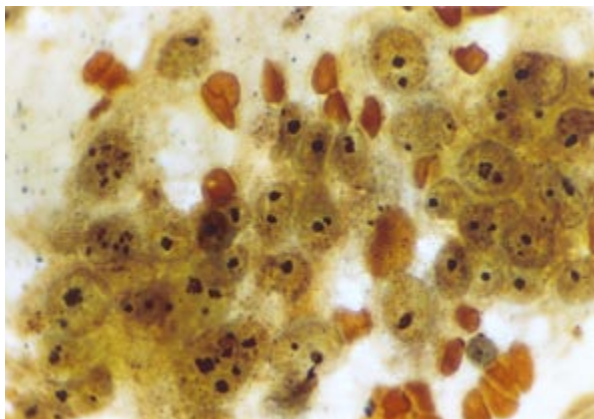


Figura 2. Carcinoma complejo, $\bar{x} = 3,2$ AgNOR/núcleo. Técnica de Howell, 1000 X.

Tabla 1. Tipos tumorales diagnosticados por citología.

tipo	n
adenoma complejo	2
tumor mixto	2
carcinoma complejo	17
carcinoma en tumor mixto	15
carcinoma simple	5
carcinoma anaplásico	4
total	45

Tabla 2. Relación entre el tipo tumoral (diagnosticado por citología) y el grado de pleomorfismo nuclear.

tipo	grado nuclear		
	I	II	III
carcinoma complejo	4	11	2
carcinoma en tumor mixto	3	10	2
carcinoma simple	1	2	2
carcinoma anaplásico	–	–	4

Tabla 3. Relación entre el tipo tumoral (diagnosticado por citología) y el recuento de AgNOR por núcleo.

tipo	AgNOR ($\bar{x} \pm DE$)
carcinoma complejo	$3,2 \pm 0,7917^a$
carcinoma en tumor mixto	$4,0 \pm 1,4268^a$
carcinoma simple	$6,0 \pm 2,3184^b$
carcinoma anaplásico	$7,0 \pm 1,0801^b$

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar. En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Las neoplasias aquí analizadas fueron evaluadas citológicamente, arribándose al diagnóstico en todos los casos. Ello implica que dicha técnica es eficaz y aplicable a los tumores mamarios caninos. El bajo porcentaje de tumores benignos hallados difiere en forma llamativa con las altas tasas comunicadas por otros autores^{19,20}.

En cuanto a la aplicación de la graduación nuclear, se observa una clara correspondencia entre los grados nucleares II y III y los tipos tumorales de peor pronóstico, en concordancia con algunos estudios anteriores³⁰. Con respecto al método de cuantificación de AgNOR/núcleo, se corroboran las dificultades técnicas consignadas en otros estudios²⁷. En efecto, el recuento objetivo de cada AgNOR resultó engorroso, ya que a veces se observaron pequeños puntos dispersos en la zona nucleolar, otras veces se encontraron juntos, superpuestos y formando uno o más grandes nucléolos.

El análisis estadístico de los resultados de la marcación de AgNOR/núcleo mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dos grupos de tumores. Estos datos coinciden con aseveraciones de otros autores^{5,10,18}.

Se concluye que la graduación nuclear y la marcación de regiones organizadoras de nucléolos constituyen un complemento válido del citodiagnóstico de tumores mamarios caninos.

REFERENCIAS

1. Akhtar M, Ashraf A, Huq M, Faulkner C. 1989. Fine-needle biopsy: comparison of cellular yield with and without aspiration. *Diagn Cytopath* 5: 162–165.
2. Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA. 1986. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol* 23: 649–655.
3. Bloom HJ, Richardson WW. 1957. Histologic grading and prognosis in breast cancer: A study of 1709 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 2: 353–377.
4. Bostock DE, Moriarty J, Crocker J. 1992. Correlation between histologic diagnosis mean nucleolar organizer region count and prognosis in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 29: 381–385.
5. Bratulic M, Grabarevic Z, Artukovic B, Capak D. 1996. Number of nucleoli and nucleolar organizer regions per nucleous and nucleolus. Prognostic value in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 33: 527–532.
6. Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 19: 61–90.
7. Caballero T, Díaz-Flores L, Sánchez-Salgado G, Aneiros J, Salidos E. 1980. Correlación entre la citología exfoliativa y los cortes histológicos en biopsias intraoperatorias. *Morfol Norm y Patol B-4*: 329-392.
8. Cajulis R, Sneige N. 1993. Objective comparison of cellular yield in fine-needle biopsy of lymph nodes with and without aspiration. *Diagn Cytopathol* 9: 43–45.
9. Candanosa E, Buen N, Trigo FJ. 1987. Correlación citohistológica de las lesiones cutáneas en perro. *Vet Méx* 18: 3-11.
10. Castagnaro M, Casalone C, Ru G. 1998. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci* 64: 97–100.
11. Elston CW, Ellis IO. 1993. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* 46: 189–190.
12. Graham JC, Myers RK. 1999. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 13: 416–418.
13. Griffiths H, Lumsden JW, Vallt VE. 1984 Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol* 13: 13–17.
14. Hellmen E, Bergström R, Holmberg L, Spangberg IB, Hansson K, Lindgren A. 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: A multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30: 20–27.
15. Howell WM. 1982. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: *The Cell Nucleus* (Buch H, Rothblum L Ed), Academic Press, New York, p. 89–142.
16. Löhr CV, Teifke JP, Failing K, Weiss E. 1997. Characterization of the proliferation state in canine mammary tumors by standardized AgNOR method with postfixation and immunohistologic detection of Ki-67 and PCNA. *Vet Pathol* 34 : 212–221.
17. Macció OA, Rosciani AS, Merlo WA, Borda JT. 1997. Tipificación de tumores mamarios caninos mediante citología por punción con aguja fina. *Rev Vet* 8/9: 13–21.
18. Madewell BR. 2001. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med* 15: 334–340.
19. Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb TP. 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. Volume VII. Publ. Armed Forces Institute of Pathology and WHO, Washington, 58 p.
20. Moulton JE. 1990. Tumors of the mammary gland. In: *Tumors in Domestic Animals* (Moulton JE Ed), 3rd ed., California Press, Berkeley, p. 518–553.
21. Restucci B, De Vico G, Maiolino P. 2000. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. *Vet Pathol* 37: 297–301.
22. Rosciani AS, Montenegro MA, Merlo WA, Pérez-Gianeselli MR, Macció OA, Sánchez-Negrette M. 1994. Diagnóstico citológico en diferentes especies animales. *Anales XV Sesión de Comunicaciones Científicas*, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Corrientes, p. 22.
23. Sarli G, Preziosi R, Benazzi G, Castellani G, Marcato PS. 2002. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 14: 25–34.
24. Sockal RR, Rohlf FJ. 2001. *Biometry*, 3rd ed., Freeman, New York, 980 p.
25. Tavasoli FA. 1999. *Pathology of the Breast*, 2nd ed., Appleton & Lange, Stamford, 999 p.
26. Tejada AN, Soto ZE, Flores JP, Gómez G, Cuervo LF, Ceceña LA, Garza R. 1994. Utilidad y efectividad del examen citológico mediante impronta del tejido enviado para examen trasoperatorio. Resúmenes de la XXXVII Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Patólogos, Morelia. *Patología*, 32: S1–S28.
27. Trére D. 2000. Ag NOR staining and quantification. *Micron* 31: 127–131.
28. Tyler RD, Cowell RL, Baldwin CJ, Morton RJ. 1993. *Diagnostic cytology in the dog and cat*, Mosby, London, p. 1–19.
29. Wellman NL. 1990. The cytology diagnosis of neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 20: 919–938.
30. Zadjela A, De La Riva LS, Ghossein NA. 1979. The relation of prognosis to the nuclear diameter of breast cancer cells obtained by cytologic aspiration. *Acta Cytol* 23: 75–80.