DANILO GOUVEIA WASQUES

**Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos
no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e
determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e
marcadores imuno-histoquímicos**

São Paulo
2018

DANILO GOUVEIA WASQUES

Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Cogliati

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3677
FMVZ

Wasques, Danilo Gouveia

Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos / Danilo Gouveia Wasques. – 2018.

163 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

1. Transição epitélio-mesenquimal. 2. Análise de sobrevivência. 3. Reprodutibilidade. 4. Perianal. 5. Patologia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos", protocolada sob o CEUA nº 4945080716 (ID 003044), sob a responsabilidade de **Bruno Cogliati e equipe; Danilo Gouveia Wasques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/01/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of interobserver agreement of morphological criteria in the diagnosis of hepatoid gland tumors in dogs and determination of the prognostic value of clinicopathological aspects and immunohistochemical markers", utilizing 50 Dogs (males and females), protocol number CEUA 4945080716 (ID 003044), under the responsibility of **Bruno Cogliati and team; Danilo Gouveia Wasques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **07/2018**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 20 anos**

N: **50**

Linhagem: **Diversas**

Peso: **1 a 100 kg**

Local do experimento: Não se aplica.

São Paulo, 05 de julho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 05 de julho de 2018
CEUA N [4945080716](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Bruno Cogliati

Área: Patologia Experimental E Comparada

Título da proposta: "Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP (ID 003542)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 04/julho/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicita-se a inclusão de 12 animais extras, os quais foram selecionados devido seu grau de agressividade e presença de metástases. Assim, o numero total de animais ficaria em 62 amostras, incluindo os 50 animais previamente aprovadas."

Comentário da CEUA: "Solicitação justificada para inclusão de 12 animais extras, os quais foram selecionados devido seu grau de agressividade e presença de metástases. Assim, o numero total de animais ficaria em 62 amostras, incluindo os 50 animais previamente aprovadas."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: WASQUES, Danilo Gouveia

Título: Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos colegas patologistas que colaboraram na exaustiva tarefa de avaliar minuciosamente os diversos casos em estudo, e também por contribuírem com ideias e decisões importantes acerca de eventuais impasses encontrados: Maíra Bonamin Martins, Juliana Mariotti Guerra, Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes e Emerson Flávio Freitas Mota.

Aos valiosos ensinamentos e orientação de Ísis Paixão na realização das análises imuno-histoquímicas, sem os quais parte importante deste estudo não seria possível de ser realizado.

Aos diversos colegas clínicos veterinários responsáveis pelos casos incluídos no estudo, que de maneira impecável mantiveram o registro das informações clínicas de seus pacientes, e que puderam compartilhar estas proveitosas informações para que pudessemos investigar possíveis impactos clínicos de nossos achados: José Eduardo Cunha, Flávia Kulikovsky, Marta Mendes Neves, Mirian Galletti Delazari, Thais Vianna (e seu irmão), Fernando Lordão, Mara Lombardi, Leandro Tinelli, Marisa Tanaka, Vanessa Carla Paiva, Dante Ragassi e Andrea Acaui, Marina de Oliveira, Luciana Mega, Milena Castor, Marisa Monteiro e Marcelo Kondor, Cíntia Veiga, Luis Fernando Melo, José Ricardo Carvalho, Marcos Fábio Parreira, Larissa Torres de Amorim, Carlos Augusto D'Alkimin Filho, Regis Santoro Patitucci e Miguel Ziegler, Vitor Rutkowski, Anita Baptista do Carmo e Claudio Contreras, Patricia Friggi de Souza, Jamara Alves Siqueira, Fernanda Nogueira, Danielle Almeida Zanini e Paulo Reviglio, João Francisco Guilherme e Thabata Pelayo Poli.

Aos Profs. Drs. Bruno Cogliati e Maria Lucia Zaidan Dagli que acolheram minha proposta de pesquisa e por estarem sempre de portas abertas para o desenvolvimento do estudo.

Aos Profs. Stefano Carlo Filippo Hagen e Ricardo José Garcia Pereira, pela condução das diversas sessões de discussões e debates acerca de temas diversos do mundo científico, que com certeza colaboraram para construção de uma visão mais crítica de nossa participação e percepção deste universo (thank God I survived the infamous cloud!)

Aos colegas de laboratório David Salas Gomes, Veronica Pitorri, Veronica Mollica, Tereza Cristina da Silva e Julieta Porto pela boa convivência (apesar de minha intermitente presença no laboratório) e proveitosas reuniões e discussões científicas.

À minha família, que ao seu modo sempre me apoiou em minhas empreitadas acadêmicas, e aos meus irmãos que esperam ansiosamente o depósito desta dissertação para que possamos celebrar com altos campeonatos de Street Fighter, pôquer, truco e banco imobiliário.

E à minha amada esposa, Tatiana Reis, sempre paciente com meus momentos de ausência durante este período, e que sempre me motivou nos momentos mais difíceis desta caminhada.

RESUMO

WASQUES, D.G. **Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos** [Evaluation of interobserver agreement of morphological criteria in the diagnosis of hepatoid gland tumors in dogs and determination of the prognostic value of clinicopathological aspects and immunohistochemical markers]. 2018. 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Diferentes estudos têm demonstrado uma variação importante na frequência diagnóstica dos tumores de glândula hepatoide em cães, possivelmente devido à ausência de critérios morfológicos claros e bem estabelecidos em seu diagnóstico. Não estão bem definidos os critérios clínico-patológicos associados ao comportamento biológico destas neoplasias. Alguns estudos levantam a hipótese de participação do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal devido à frequente imunoexpressão de vimentina em tumores de glândula hepatoide, porém esta hipótese permanece sem comprovação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concordância diagnóstica entre patologistas, assim como investigar o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal e a taxa de proliferação celular por marcadores imuno-histoquímicos e, por fim, correlacioná-los com sobrevida para investigação de possíveis valores prognósticos. Cinco patologistas avaliaram 57 tumores de glândula hepatoide quanto ao diagnóstico e quanto a diversos critérios morfológicos e, com base nestes critérios, foram desenvolvidos algoritmos diagnósticos por meio de árvores de regressão por partição recursiva. Adicionalmente, foram investigadas as imunoexpressões de vimentina, pancitoqueratina, E-caderina e Ki-67 em 78 lesões, comparando-as entre glândulas normais, tumores benignos, tumores malignos e tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos. A sobrevida livre de recorrência local, recorrência da doença, sobrevida global e sobrevida doença-específica foram investigadas em 33 pacientes. Houve concordância média razoável em análise interobservador quanto ao diagnóstico ($\kappa=0,54$), com potencial de melhora para concordância média boa após aplicação de dois novos algoritmos diagnósticos ($\kappa=0,64$ e $0,65$, respectivamente). Em relação aos marcadores imuno-histoquímicos, foram observadas maior expressão de vimentina e menor expressão de E-caderina em tumores malignos em comparação aos tumores benignos. Adicionalmente, observou-se uma forte correlação negativa entre a

expressão de vimentina em células de reserva e expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas ($\rho=-0,65$, $p<0,0001$), além de maiores taxas de proliferação celular (Ki-67) e contagem de mitoses em tumores malignos em comparação com tumores benignos. Em análise univariada de sobrevida doença-específica, os fatores prognósticos foram a presença de invasão vascular ou metástase no momento do diagnóstico, o escore de E-caderina em células de reserva e diferenciadas, e o tamanho tumoral. Em relação ao tempo de sobrevida livre de doença, os fatores prognósticos foram a presença de invasão vascular ou metástase no momento do diagnóstico, escore de E-caderina em células de reserva e diferenciadas, perda de polaridade celular, grau de infiltração, histórico de doença recorrente, escore de morfologia fusiforme e proporção de células de reserva. Os resultados do presente estudo confirmaram que existe um grau de discordância diagnóstica entre patologistas que poderia explicar parte da variação observada na prevalência de carcinomas de glândula hepatoide em literatura, e de que existe potencial para melhora da concordância diagnóstica por meio dos algoritmos propostos. Ainda, os achados reforçaram a hipótese de que o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal participa na progressão tumoral em neoplasias hepatoides em cães, explicando a frequente imunoexpressão de vimentina observada nestes tumores. Por fim, foi demonstrado que a presença de invasão vascular ou metástase no momento do diagnóstico tem impacto significativo na sobrevida dos animais, assim como há outras características clínicas, morfológicas e imuno-histoquímicas com valor prognóstico para recorrência da doença e sobrevida.

Palavras-chave: Transição epitélio-mesenquimal. Análise de sobrevida. Reprodutibilidade. Perianal. Patologia

ABSTRACT

WASQUES, D.G. Evaluation of interobserver agreement of morphological criteria in the diagnosis of hepatoid gland tumors in dogs and determination of the prognostic value of clinicopathological aspects and immunohistochemical markers [Avaliação da concordância interobservadores de critérios morfológicos no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide em cães e determinação do valor prognóstico de aspectos clínico-patológicos e marcadores imuno-histoquímicos]. 2018. 163f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

An important variation in the prevalence of canine hepatoid gland carcinoma is currently reported, likely due to lack of consistent and well-defined criteria. Additionally, clinical and pathological features predictive of biological behavior are not well defined. The epithelial-mesenchymal transition mechanism has been proposed as a possible explanation for the frequent expression of vimentin by neoplastic hepatoid gland cells, but this hypothesis remains elusive. The present study aimed to define the level of diagnostic agreement between different pathologists, investigate immunohistochemical and morphological features indicative of epithelial-mesenchymal transition, and to evaluate candidate features that might be predictive of biological behavior. Five pathologists diagnosed and classified morphological features for 57 hepatoid gland tumors, and diagnostic algorithms were built with recursive partitioning analysis. Additionally, vimentin, pancytokeratin, E-cadherin and ki-67 immunohistochemical expression were evaluated for 78 lesions, and expression levels were compared between normal glands, benign tumors, malignant tumors, and vasculo-invasive/metastatic tumors. Local recurrence free survival, disease free survival, overall survival and disease-specific survival were evaluated for 33 cases. There was a fair mean interobserver agreement for diagnosis ($\kappa=0,54$), that could potentially be improved to a good mean agreement with the use of two novel diagnostic algorithms ($\kappa=0,64$ and $0,65$). Additionally, higher levels of vimentin expression and lower levels of E-cadherin expression were noted in malignant tumors, as compared to benign tumors, and there was a strong negative correlation between vimentin expression in reserve cells and pancytokeratin expression in differentiated cells ($\rho=-0,65$, $p<0,0001$). Proliferation index (ki67) and mitotic count were higher for malignant tumors when compared to benign tumors. In univariate survival analysis, vascular invasion or metastasis at the time of diagnosis, E-cadherin

score in differentiated and reserve cells and tumor size were predictive of disease-specific survival. Vascular invasion or metastasis at the time of diagnosis, E-cadherin score in differentiated and reserve cells, loss of cell polarity, grade of invasiveness, history of recurrent disease, spindle cell morphology score and proportion of reserve cells were predictive of disease-free survival. The results of this study demonstrate a level of diagnostic disagreement between pathologists that might explain, at least partially, the variation of prevalence of hepatoid gland carcinoma in current literature, and that this diagnostic agreement could potentially be improved. Also, these findings support the role of epithelial-mesenchymal transition in the progression of canine hepatoid gland tumors, and this mechanism could explain the frequent expression of vimentin in this particular neoplasia. Finally, it was shown that vascular invasion or metastasis at the time of diagnosis has a significant impact on survival, and that additional clinical, morphological and immunohistochemical features might also have predictive value for disease recurrence and survival.

Keywords: Epithelial-mesenchymal transition. Survival analysis. Reproducibility. Perianal. Pathology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	TUMORES DE GLÂNDULA HEPATOIDE	19
2.1.1	Epidemiologia e etiopatogênese	19
2.1.2	Aspectos clínicos e achados laboratoriais	21
2.1.3	Classificação anatomopatológica e métodos diagnósticos	23
2.1.4	Marcadores imuno-histoquímicos aplicados em tumores de glândula hepatoide.	24
2.1.5	Marcadores de proliferação celular	27
2.1.6	Tratamento	28
2.1.7	Fatores prognósticos	30
2.1.8	O problema da variação de prevalência dos tumores hepatoides	31
2.2	A REPRODUTIBILIDADE NA PATOLOGIA	34
2.2.1	Processos individuais, formais e normativos envolvidos no diagnóstico anatomopatológico	34
2.2.2	Métodos de avaliação da concordância em anatomia patológica	37
2.2.3	Estudos de concordância diagnóstica em patologia veterinária	39
2.2.4	Reprodutibilidade do diagnóstico das neoplasias hepatoides	40
2.3	A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E SUA PARTICIPAÇÃO NA ONCOGÊNESE	40
2.3.1	Contestações acerca da teoria da transição epitélio-mesenquimal.	45
2.3.2	A transição epitélio-mesenquimal na oncologia veterinária	47
2.3.3	Evidências de transição epitélio-mesenquimal em tumores de glândula hepatoide.	49
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	LEVANTAMENTO DE CASOS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	52
4.2	ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE	53
4.3	CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS ADICIONAIS	56
4.4	REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	56
4.4.1	Procedimento técnico	56
4.4.2	Controle de qualidade.	57
4.4.3	Análise morfológica e semi-quantitativa da imunoexpressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal.	58
4.4.4	Avaliação da taxa de proliferação celular	60
4.5	COLETA DE DADOS DE SEGUIMENTO	61
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62

5	RESULTADOS	65
5.1	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E ANATOMOPATOLÓGICA	65
5.2	ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE	70
5.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	82
5.4	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	103
6	DISCUSSÃO	120
7	CONCLUSÕES	138
	REFERÊNCIAS	139
	APÊNDICES	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema CoPeTi	37
Figura 2 - Exemplificação do método de contagem de ki-67	60
Figura 3 - Características morfológicas dos tumores de glândula hepatoide	68
Figura 4 - Gráficos de barras: frequências de diagnóstico por patologista	71
Figura 5 - Impacto da correção por área na concordância de contagem de mitoses	79
Figura 6 - Algoritmo diagnóstico 1	80
Figura 7 - Algoritmo diagnóstico 2	81
Figura 8 - Impacto dos Algoritmos em concordância	81
Figura 9 - Padrões de expressão imuno-histoquímica de vimentina em tumores hepatoides	83
Figura 10 - Padrões de expressão imuno-histoquímica de pancitoqueratina em tumores hepatoides	85
Figura 11 - Padrões de expressão imuno-histoquímica de E-caderina em tumores hepatoides	86
Figura 12 - Expressão imuno-histoquímica em frentes de invasão estromal e invasão vascular	88
Figura 13 - Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em áreas com células neoplásicas de morfologia fusiforme.	89
Figura 14 - Comparação entre marcadores imuno-histoquímicos em adenoma de glândula hepatoide	90
Figura 15 - Box-plots: Escores da imunoexpressão de vimentina, pancitoqueratina e E-caderina	93
Figura 16 - Box-plots: E-caderina citoplasmática, morfologia fusiforme, contagem de mitoses e ki67	96
Figura 17 - Scatter-plots: testes de correlação.	98
Figura 18 - Box-plot: Taxa de proliferação (Ki67) por grau de concordância diagnóstica	101
Figura 19 - Curva ROC: Sensibilidade e especificidade da taxa de proliferação (Ki67) para o diagnóstico de malignidade, de acordo com o patologista	103
Figura 20 - Kaplan-Meier: Diagnóstico	108
Figura 21 - Kaplan-Meier: variáveis (recorrência local)	111
Figura 22 - Kaplan-Meier: variáveis (intervalo livre de doença)	114
Figura 23 - Kaplan-Meier: variáveis (sobrevida global)	117
Figura 24 - Kaplan-Meier: variáveis (sobrevida doença-específica)	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Detalhamento de dados clínicos de pacientes incluídos em estudo	69
Tabela 2 - Concordância interobservador - diagnóstico	72
Tabela 3 - Concordância intraobservador - diagnóstico	72
Tabela 4 - Concordância interobservador - contagem de mitoses(/2,37mm ²)	73
Tabela 5 - Concordância interobservador - atipia celular	74
Tabela 6 - Concordância interobservador - perda de polaridade	74
Tabela 7 - Concordância interobservador - células de reserva	75
Tabela 8 - Concordância interobservador - diferenciação sebácea.	75
Tabela 9 - Concordância interobservador - atipia mitótica.	76
Tabela 10 - Concordância interobservador - grau de infiltração.	76
Tabela 11 - Concordância interobservador - necrose tumoral	77
Tabela 12 - Concordância interobservador - diferenciação escamosa.	77
Tabela 13 - Concordância interobservador - mitoses em células diferenciadas	78
Tabela 14 - Concordância interobservador - invasão vascular	78
Tabela 15 - Concordância interobservador - Lista de resultados (κ)	79
Tabela 16 - Concordância interobservador - Lista de resultados (ICC)	79
Tabela 17 - Escores de marcação imuno-histoquímica	87
Tabela 18 - Escores de morfologia fusiforme, E-caderina citoplasmática e proliferação	91
Tabela 19 - Comparações entre os diferentes grupos diagnósticos e a expressão de marcadores imuno-histoquímicos.	94
Tabela 20 - Comparações entre os diferentes grupos diagnósticos, expressão de marcadores imuno-histoquímicos, morfologia fusiforme e atividade proliferativa	97
Tabela 21 - Matriz de correlações de EMT e proliferação.	100
Tabela 22 - Valores de Taxa de proliferação (Ki67) por grau de concordância diagnóstica	102
Tabela 23 - Pontos de corte de taxa de proliferação (Ki67) para o diagnóstico de malignidade de acordo com o patologista.	102
Tabela 24 - Detalhamento do recebimento de informações de seguimento	104
Tabela 25 - Detalhamento de dados clínicos dos pacientes em seguimento.	106
Tabela 26 - Detalhamento dos casos de óbito em seguimento.	107
Tabela 27 - Variáveis preditivas de intervalo livre de recorrência local.	108
Tabela 28 - Variáveis preditivas de intervalo livre de doença	109
Tabela 29 - Variáveis preditivas de sobrevida global	109
Tabela 30 - Variáveis preditivas de sobrevida doença-específica	109
Tabela 31 - Variáveis associadas a recorrência local: pontos de corte, % sobrevida livre de recorrência local em 1 ano, sobrevida mediana livre de recorrência local, e área sob curva ROC	110
Tabela 32 - Variáveis associadas a recorrência: pontos de corte, % sobrevida livre de recorrência em 1 ano, sobrevida mediana livre de recorrência , e área sob curva ROC	113

Tabela 33 - Variáveis associadas a sobrevida global: pontos de corte, % sobrevida global em 1 ano, sobrevida mediana global, e área sob curva ROC . . .	116
Tabela 34 - Variáveis associadas a sobrevida doença-específica: pontos de corte, % sobrevida doença-específica em 1 ano, sobrevida mediana doença-específica, e área sob curva ROC.	118

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Prevalências de carcinomas de glândula hepatoide	32
Quadro 2 - Diretrizes para interpretação de κ - Landis e Koch	38
Quadro 3 - Diretrizes para interpretação de κ e ICC- Cicchetti e Sparrow	38
Quadro 4 - Detalhamento de critérios morfológicos de análise histopatológica . . .	55
Quadro 5 - Detalhamento de metodologia imuno-histoquímica	57
Quadro 6 - Escore semi-quantitativo aplicado em análise imuno-histoquímica . . .	59

1 INTRODUÇÃO

O patologista envolvido na atividade de diagnóstico oncológico carrega uma grande responsabilidade em sua prática diária: ao receber de um clínico, cirurgião ou oncologista uma amostra para a confecção de um relatório anatomopatológico, a pergunta a ser respondida é clara, apesar de frequentemente não explicitada: é uma lesão neoplásica? É benigno ou maligno? Adequado ou não adequado para o diagnóstico? Trato ou não trato? Agressivo ou indolente? Para além da pura aplicação de critérios técnico-científicos na interpretação de uma lesão, o patologista também se vê envolvido em uma torrente de expectativas, anseios e obrigações médico-legais, que irão, invariavelmente, e em maior ou menor grau, impactar no diagnóstico morfológico.

A prática da discussão de casos duvidosos ou raros entre patologistas é uma cultura comum, cientes de que tais casos demonstram uma margem não negligenciável para erros de interpretação e conscientes de sua responsabilidade para com o paciente. Não raro, a discordância de opiniões entre patologistas pode gerar no oncologista uma situação de indecisão com relação à conduta a ser tomada, e pode ser encarada com resignação ou inquietação por parte dos proprietários dos animais. Neste contexto, se faz necessária a aplicação de métodos diagnósticos mais precisos e menos sujeitos a erros de interpretação, e que permitam que o patologista ofereça ao oncologista um relatório de maior valor clínico e de maior consistência.

Os tumores de glândula hepatoide são uma das mais comuns neoplasias em cães, e alguns autores em literatura veterinária tem manifestado a percepção de que existe uma dificuldade na distinção entre uma neoplasia hepatoide benigna e uma neoplasia maligna (GROSS et al., 2005; GANGULY; WOLFE, 2006). A grande variação de prevalências de carcinoma hepatoide observada em literatura atual, que varia de 3,3 a 54,5% em relação ao total de tumores hepatoides (Quadro 1), parece indicar que esta dificuldade é disseminada. Assim, se faz necessária a averiguação do grau de concordância entre múltiplos patologistas, com o objetivo de buscar maneiras de se melhorar a reprodutibilidade diagnóstica. Ainda, considerando a escassez de literatura atual e a imperativa importância de se obter uma classificação diagnóstica de valor clínico, é essencial que sejam também investigados quais critérios clínicos e patológicos (histomorfológicos e imuno-histoquímicos) possam ser fatores preditivos do comportamento biológico destas neoplasias, e que estejam combinados a uma maior reprodutibilidade.

Um caminho interessante a ser investigado é o mecanismo de transição

epitélio-mesenquimal, já que há alguns indícios em literatura atual de que ele possa ocorrer com frequência em neoplasias de glândula hepatoide (ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN et al., 2016), e a investigação deste processo por meio de marcadores imuno-histoquímicos, como vimentina, citoqueratinas e E-caderina, tem demonstrado valor prognóstico para neoplasias de outras origens (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008; BONGIOVANNI et al., 2013; RISMANCHI et al., 2014).

Portanto, com este estudo, pretende-se dar o primeiro passo na investigação de discordâncias entre patologistas para esta neoplasia em particular, bem como no desenvolvimento de métodos mais reprodutíveis de diagnóstico e avaliação de possíveis critérios que possam futuramente ter maior valor clínico, com o objetivo de aprimorar a tomada de decisões por parte dos oncologistas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TUMORES DE GLÂNDULA HEPATOIDE

2.1.1 Epidemiologia e etiopatogênese

Os tumores de glândula hepatoide compreendem cerca de 5,8 a 13,5% das neoplasias cutâneas em cães, ficando atrás apenas dos mastocitomas em alguns levantamentos, e representam cerca de 1,5 a 6,19% do total de lesões neoplásicas nesta espécie (FINNIE; BOSTOCK, 1979; ROTHWELL et al., 1987; ER; SUTTON, 1989; KALDRYMIDOU et al., 2002; BHAIYAT et al., 2013; ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN et al., 2013). Existe uma forte predileção por sexo, sendo que 77 a 86,4% das neoplasias hepatoides ocorrem em machos, quantidade significativamente maior que as populações de referência em diversos estudos (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; HAYES; WILSON, 1977; ROTHWELL et al., 1987; ER; SUTTON, 1989). Considerando o status sexual, estas neoplasias ocorrem mais frequentemente em cães machos inteiros, representando cerca de 98 a 99% dos casos. Por outro lado, o inverso ocorre em fêmeas; embora a ocorrência de neoplasias hepatoides neste sexo seja menor, é mais frequente em fêmeas castradas, representando cerca de 57 a 70,5% dos casos (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; HAYES; WILSON, 1977).

Diversas evidências sugerem que as neoplasias de glândula hepatoide sejam hormônio-dependentes. De fato, a alta predileção por cães machos inteiros, bem como a regressão das lesões tumorais após a castração na maioria dos casos, indicam que o seu desenvolvimento e manutenção são dependentes de estímulos androgênicos. Por outro lado, a maior prevalência destes tumores em fêmeas castradas sugere um fator protetor dos estrógenos (WILSON; HAYES, 1979; ASSUNÇÃO, 2003). Alguns estudos têm demonstrado a presença de receptores para andrógenos (testosterona e 5α -dihidrotestosterona) e estrógenos (estradiol- 17β) em células hepatoides, os quais apresentam uma maior imunoexpressão em tecidos hiperplásicos quando comparados com os tecidos normal ou neoplásico (CHAISSIRI; PIERREPOINT, 1979; PISANI et al., 2006). A eficiência quimioterápica do hormônio sintético dietilestilbestrol também acompanha esta tese, possivelmente exercendo seu efeito não apenas pela ação direta em receptores estrogênicos das células tumorais, mas também pela inibição da secreção de

LH pela hipófise e, conseqüentemente, diminuição da produção de testosterona testicular (RIVIERE; PAPICH, 2018).

Como mencionado anteriormente, a participação de hormônios estrogênicos não é menos importante, uma vez que a maior prevalência de tumores hepatoides em fêmeas castradas, em comparação com fêmeas inteiras, sugere um fator protetor do estrógeno no desenvolvimento de tumores hepatoides. Um estudo de ensaio de radioatividade demonstrou o potencial de redução da ligação de andrógenos de seus receptores citoplasmáticos na presença de estradiol- 17β em células de adenoma (CHASIRI; PIERREPOINT, 1979). Ainda, machos inteiros com tumor de células de Sertoli, neoplasia testicular que cursa com feminização, devido ao hiperestrogenismo, em cerca de 23% dos casos, demonstra menor prevalência de tumores hepatoides concomitantes em comparação com animais sem neoplasias testiculares ou com seminomas ou tumores de células intersticiais (LIPOWITZ et al., 1973; HAYES; WILSON, 1977). Este efeito protetor do estrógeno não é, no entanto, isento de controvérsias. Dois estudos demonstraram uma alta eficácia no tratamento de neoplasias hepatoides em cães com o uso de tamoxifeno, um agente antagonista de receptores de estrógeno. Embora não seja possível descartar que a eficácia do tamoxifeno possa ser resultado de outras vias de atuação desta droga, como na indução de apoptose e inibição de proliferação endotelial pela modulação da síntese de VEGF, estes achados sugerem que é possível que seja necessária uma participação sinérgica de estrógenos e andrógenos para o desenvolvimento destes tumores (BRODZKI et al., 2014; SOBCZYNSKA-RAK; BRODZKI, 2014).

As neoplasias testiculares são frequentemente encontradas em cães com tumores de glândula hepatoide, com um maior risco para a presença de tumores de células intersticiais (tumores de células de Leydig, risco relativo de 1,7) e um menor risco para a presença de tumores de células de Sertoli (risco relativo de 0,4) em comparação com a população de referência (cães machos com múltiplos tumores primários). Para o seminoma, porém, não foi encontrada diferença significativa de risco (HAYES; WILSON, 1977). Adicionalmente, cães com tumores de células intersticiais ou seminomas demonstram maior prevalência de tumores hepatoides (presentes em 46,3 e 29,7% dos casos, respectivamente) se comparados com cães portadores de tumor de células de Sertoli (10,8%) (LIPOWITZ et al., 1973). Estes achados são evidências importantes que sugerem que existe uma influência da produção anômala de hormônios por parte de tumores testiculares no desenvolvimento dos tumores hepatoides. Ou seja, a maior produção de andrógenos pelos tumores de células intersticiais (leydigomas) estaria associada a um maior risco de desenvolvimento de tumores hepatoides, enquanto a maior produção de hormônios estrogênicos pelos tumores de células de Sertoli seria responsável pelo

efeito protetor ao desenvolvimento tumoral (HAYES; WILSON, 1977). De fato, cães portadores de tumores de células de Sertoli demonstram relação testosterona/estradiol-17 β plasmática diminuída em comparação com animais com testículos normais ou com outras neoplasias testiculares. No entanto, a superprodução de hormônios androgênicos por tumores de células intersticiais não está bem esclarecida. Nesta neoplasia, não foram encontradas diferenças significativas nos valores plasmáticos de testosterona, estradiol-17 β e da relação testosterona/estradiol-17 β em comparação com animais sem alterações testiculares (MISCHKE et al., 2002). É possível que apenas uma pequena parte dos tumores de células intersticiais curse com hipertestosteronemia, ou que outros precursores androgênicos, não estudados por Mischke et al. (2002), estejam envolvidos.

Em fêmeas, a ocorrência de tumores de glândula hepatoide tem sido atribuída à hiperprodução de hormônios androgênicos de origem adrenal, e há relatos de ocorrência de hiperadrenocorticismos em cadelas cursando com hipertestosteronemia e ocorrência de tumores perianais (DOW et al., 1988; GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992; HORTA et al., 2011)

A idade média de ocorrência de adenomas hepatoides é de 10 anos, com pico de incidência entre 8 a 13 anos. Para carcinomas e epitelomas, a média é de 11 anos, com pico de incidência entre 9 e 13 anos (BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Algumas das raças descritas como possivelmente predispostas ao desenvolvimento de tumores de glândula hepatoide são o Cocker Spaniel, Buldogue inglês, Samoieda, Beagle, Afghan Hound, Teckel, Husky siberiano, German Wirehaired pointer, Australian cattle dog, Eskimo, Chow Chow, Bluetick coonhound, pastor belga e Malamute do Alasca (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; HAYES; WILSON, 1977; ROTHWELL et al., 1987; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

2.1.2 Aspectos clínicos e achados laboratoriais

A glândulas hepatoides caninas estão distribuídas principalmente em região perianal, mas podem ser encontradas também em terço proximal de cauda, em região dorsal lombo-sacral, lateral ao prepúcio, e ao longo de linha média ventral (GROSS et al., 2005). A maturação da glândula hepatoide é provavelmente influenciada por estímulo androgênico, e demonstra pronunciado dimorfismo sexual. A função desta glândula não está muito bem estabelecida, mas evidências sugerem que seja uma glândula odorífera que influencia no comportamento sexual da espécie. Embora tradicionalmente

interpretada como um tipo de glândula sebácea modificada, evidências mais recentes sugerem que a glândula hepatoide seja de fato uma glândula merócrina, com secreção de seus produtos por meio de canais intercelulares, e finalmente para ductos eferentes, para então alcançarem os folículos pilosos e serem excretados na superfície cutânea (SHABADASH; ZELIKINA, 2002).

Os tumores de glândula hepatoide localizam-se na maioria dos casos em região perianal (mais de 80% dos casos), daí também serem denominados de tumores de glândula perianal ou de glândula circumanal. A cauda é o segundo local mais acometido, representando cerca de 4% a 10% dos casos, e outras regiões menos frequentemente acometidas incluem o prepúcio ou região paraprepucial, quadril, coxa, região lombar ou dorsal (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992; SILVA; PELETEIRO; CORREIA, 2002; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Embora apresente-se na maioria dos casos como massas solitárias, observa-se ocasionalmente apresentação como múltiplas formações (MULLIGAN, 1949; NIELSON; AFTOSMIS, 1964; VAIL et al., 1990; JAVANBAKHT et al., 2013).

Algumas das queixas clínicas mais frequentemente relatadas, além da óbvia percepção da formação tumoral, incluem a ulceração da lesão (51 a 58% dos casos), sangramento da lesão (14,4%) , dor/irritação perianal (22%), prurido (5,4%) e tenesmo (4 a 10%) (BERROCAL et al., 1989; VAIL et al., 1990).

O estadiamento clínico para tumores de glândula hepatoide tem sido aplicado de maneira semelhante ao de outras neoplasias de tecido cutâneo, de acordo com o preconizado pela OMS (OWEN; WHO, 1980). O estadiamento classifica a neoplasia, de acordo com o tamanho, em T1 (menor que 2cm), T2 (2-5cm), T3 (maior que 5cm, ou com invasão de subcutâneo, independente de tamanho) e T4 (invasão de outras estruturas, como fáscia muscular, osso ou cartilagem). A classificação de Tis é utilizada para carcinomas *in situ* (não invasivos). Com relação à metástase regional, os tumores são classificados como N0 (sem evidências de metástase regional), N1 (linfonodos ipsilaterais móveis), N2 (linfonodos contralaterais ou bilaterais móveis) e N3 (linfonodos fixos). Para a metástase à distância, são classificados como M0 (sem evidências de metástase) ou M1 (presença de metástase).

A ocorrência de hipercalcemia tem sido investigada em animais portadores de tumores de glândula hepatoide. Assunção (2003) descreveu 6/38 (15,8%) pacientes com hipercalcemia, cujos índices séricos de cálcio retornaram à normalidade após a excisão cirúrgica da formação. De maneira semelhante, Javanbakht et al. (2013) relataram a ocorrência de hipercalcemia em um caso de múltiplas formações hepatoides perianais,

embora não tenha avaliado se houve remissão da elevação de cálcio ionizado sérico após a excisão cirúrgica. Os mecanismos envolvidos nesta associação entre tumores hepatoides e hipercalcemia não foram esclarecidos.

2.1.3 Classificação anatomopatológica e métodos diagnósticos

Os tumores de glândula hepatoide são atualmente classificados em 4 categorias diagnósticas: hiperplasia nodular, adenoma, epitelioma e carcinoma. O diagnóstico de epitelioma de glândula hepatoide foi inserido na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de tumores de animais domésticos em 1998, e representa uma neoplasia maligna de baixo grau (GOLDSCHMIDT, 1998). Embora exista uma variação importante de incidência entre diferentes levantamentos, de modo geral, os adenomas de glândula hepatoide são os mais frequentemente observados, seguidos dos carcinomas e epiteliomas (HAYES; WILSON, 1977; GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; MEIRELLES et al., 2010). O diagnóstico dos tumores de glândula hepatoide pode ser realizado por meio de exame citopatológico, biópsia incisional ou biópsia excisional (VAIL; PAGE, 2013). O uso da citopatologia permite a realização de um diagnóstico rápido e pouco invasivo, e pode ser utilizado em ocasiões em que se pretenda instituir uma quimioterapia prévia, associada ou não a exérese da neoplasia. Adicionalmente, esta técnica permite que seja realizado o diagnóstico diferencial com outras neoplasias que ocorrem na região e que demonstram prognóstico tipicamente distinto, como no caso dos adenocarcinomas da glândula do saco anal e dos mastocitomas, permitindo a seleção da melhor abordagem terapêutica a ser instituída em cada caso. A desvantagem desta técnica refere-se à dificuldade de distinção entre os carcinomas e adenomas de glândula hepatoide, devido à não possibilidade de apreciação de arquitetura tecidual e, portanto, não sendo possível investigar critérios de invasividade (VAIL; PAGE, 2013). Alguns estudos avaliaram a concordância do diagnóstico citológico com o histopatológico, observando graus variados de concordância. Assunção (2003) demonstrou uma concordância cito-histológica de 75%, com sensibilidade de 88% na detecção de carcinoma na citologia, porém com especificidade de apenas 40%. Por sua vez, Yumuşak, Çalışkan e Kutsal (2016) demonstraram uma concordância cito-histológica de 84,37%.

A biópsia incisional é uma técnica mais invasiva, mas que, em tese, deve permitir uma melhor apreciação de arquitetura tecidual e, consequentemente, uma maior acurácia no diagnóstico (VAIL; PAGE, 2013). No entanto, por contemplar apenas

uma parte da neoplasia, e considerando a variabilidade de morfologia ocasionalmente presente em tumores hepatoides, pode incorrer em um diagnóstico menos preciso, assim como já demonstrado para outros tipos tumorais (PERRY et al., 2014; SHAW; KUDNIG; FIRESTONE, 2018). Não foram encontrados estudos em literatura que tenham investigado a eficácia desta abordagem para a obtenção de diagnóstico especificamente para as neoplasias hepatoides. Por fim, a biópsia excisional permite a obtenção da amostra em sua totalidade, permitindo a investigação de critérios ouro para definição de malignidade, como a caracterização de invasão tecidual, mas sua aplicação pode não ser possível para tumores maiores e mais difusos, sem o risco de comprometimento de estruturas teciduais adjacentes (VAIL; PAGE, 2013; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Em microscopia, os adenomas se apresentam como nódulos bem delimitados, que consistem de lóbulos ou trabéculas de glândulas hepatoides, com células de reserva dispostas perifericamente, e células diferenciadas ao centro, com citoplasma amplo, acidofílico e de aspecto granular. Mitoses são raramente observadas, mais notadamente em células de reserva, e não são observadas atípicas nas células neoplásicas (GOLDSCHMIDT, 1998; GROSS et al., 2005). Alguns casos podem apresentar áreas localizadas de atipia, e alguns autores tem sugerido a designação como “carcinoma *in situ*” destes casos (GROSS et al., 2005; GANGULY; WOLFE, 2006; SPUGNINI et al., 2007). Os epitelomas são caracterizados pelo aumento no número de células de reserva em comparação com os adenomas. Os carcinomas caracterizam-se pela perda de polaridade na relação entre células de reserva e células diferenciadas, além de um maior grau de atipia celular, bem como um índice mitótico mais elevado, com mitoses presentes tanto em células de reserva quanto em células diferenciadas, sendo algumas atípicas. A presença de diferenciação sebácea em células neoplásicas tem sido descrita por alguns autores como uma sinalização de malignidade, embora outros autores não tenham dado a mesma importância para este critério histológico (GOLDSCHMIDT, 1998; GROSS et al., 2005; GINN; MANSELL; RAKICH, 2007).

2.1.4 Marcadores imuno-histoquímicos aplicados em tumores de glândula hepatoide

Diversos marcadores imuno-histoquímicos têm sido estudados em tumores de glândula hepatoide, e alguns destes estudos serão brevemente comentados nesta seção.

Um estudo avaliou a expressão de p63 em diversas neoplasias glandulares em cães, dentre elas, os carcinomas de glândula hepatoide. Os autores demonstraram que mais de 50% de células neoplásicas foram positivas em todos os casos avaliados (n=10), tanto em células de reserva quanto em células diferenciadas (SARAIVA; GÄRTNER; PIRES, 2008). Os autores citam resultados semelhantes em contrapartes benignas da neoplasia, indicando que talvez não seja um bom marcador para a distinção entre neoplasias benignas e malignas, porém os dados referentes às neoplasias benignas não foram descritos (SARAIVA; GÄRTNER; PIRES, 2008).

A imunoexpressão da proteína p53 foi avaliada em uma série de neoplasias em cães, dentre elas, 16 casos de carcinomas de glândula hepatoide. Foi observada marcação positiva em 50% destas neoplasias, sendo que a positividade foi considerada quando mais de 10% das células neoplásicas demonstravam marcação nuclear. Tumores perianais benignos não foram avaliados neste caso, não sendo possível determinar se a detecção de superexpressão da proteína p53 poderia ter utilidade diagnóstica ou prognóstica (GAMBLIN; SAGARTZ; COUTO, 1997). Outro estudo avaliou a imunoexpressão de p53 e MDM2 especificamente em tumores de glândula hepatoide, incluindo lesões benignas e malignas. Os resultados sugerem uma maior imunoexpressão de MDM2 em hiperplasias e adenomas em comparação com os carcinomas. A imunomarcação para p53 foi observada em apenas 5/65 (7,7%) casos de adenoma, porém nenhum dos casos de carcinomas (n=11) e hiperplasias (n=14) foi positivo (NAKANO; TAURA; INOUE, 2005). A discrepância entre os resultados para p53 entre os dois estudos não está, no entanto, devidamente esclarecida.

A imunoexpressão do hormônio de crescimento (GH) foi observada no citoplasma de células neoplásicas como uma marcação granular e intensa, porém não foram observadas diferenças entre os casos de adenoma e carcinoma de glândula hepatoide. Em glândulas hepatoides normais, não foi observada a imunoexpressão de GH (PETTERINO; MARTINI; CASTAGNARO, 2004).

Com relação a imunoexpressão da proteínas claudinas, há relatos que demonstram a presença das claudina-4, -5 e -7 apenas em células diferenciadas de glândula hepatoide normal, hiperplásicas e neoplásicas. Os casos de epiteloma foram descritos como negativos para claudina-7 e com alguns casos positivos para claudina-4 e -5 no componente celular bem diferenciado (JAKAB et al., 2010b; JAKAB et al., 2010a; JAKAB et al., 2009). Embora a imunomarcação tenha sido positiva tanto em adenomas quanto em carcinomas, foi relatado um padrão de marcação celular diferenciado para a claudina-7. Nos adenomas, foi observada marcação membranosa, enquanto que, nos carcinomas, além da marcação membranosa, foi observada também marcação

citoplasmática não granular em 10 a 40% das células (JAKAB et al., 2010b). No entanto, o significado biológico desta marcação citoplasmática e sua relação com a progressão tumoral em tumores hepatoides não foi esclarecido.

Pisani et al. (2006) demonstraram marcação nuclear para receptores de andrógenos em células de reserva e diferenciadas de tecido hepatoide normal, hiperplásico e neoplásico (lesões benignas e malignas). Os autores identificaram uma proporção significativamente maior de células positivas em lesões de hiperplasia em relação às outras categorias, porém não foram observadas diferenças entre tumores benignos e malignos. Por fim, uma marcação citoplasmática discreta a moderada foi também observada em alguns casos (PISANI et al., 2006).

A expressão de citoqueratinas (CK) em tumores de glândula hepatoide foi avaliada em alguns estudos por imuno-histoquímica (WALTER, 2000; JASIK; KOZACZYNSKI; REICHERT, 2009; PIEPER et al., 2015). Em um deles, contemplando apenas três adenomas e um carcinoma, foi observado um padrão de marcação CK7-/CK14+, sendo considerados positivos quando mais de 5% de células neoplásicas apresentassem marcação citoplasmática. Com exceção dos adenocarcinomas de glândula do saco anal, que apresentaram padrão de marcação CK7+/CK14-, todos os outros tumores epiteliais avaliados no mesmo estudo apresentaram o mesmo padrão de marcação, incluindo os tumores sebáceos, carcinomas basais, tricoepiteliomas, tumores apócrinos e de glândula ceruminosa (PIEPER et al., 2015). Os autores destacam que, apesar do pequeno número de amostras, este padrão de marcação entre as CK7/CK14 poderia ser útil na diferenciação entre carcinoma hepatoide e adenocarcinoma de glândula de saco anal pouco diferenciados. Adicionalmente, a imunoexpressão das citoqueratinas CK1 (LP34) e CK14 (LL002) foi relatada em células diferenciadas de tumores hepatoides benignos e malignos, enquanto que as células de reserva demonstram positividade para pancitoqueratina (MNf116) e citoqueratinas básicas (AE3) (JASIK; KOZACZYNSKI; REICHERT, 2009; WALTER, 2000).

A imunoexpressão de enolase neurônio específica (NSE) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) também foi investigada e observada em 6/16 casos de adenoma de glândula hepatoide (JASIK; KOZACZYNSKI; REICHERT, 2009).

2.1.5 Marcadores de proliferação celular

Com relação à atividade proliferativa, alguns estudos têm avaliado taxa de proliferação celular (HUNG et al., 2000) e também de apoptose (MARTINS et al., 2008) em tumores de glândula hepatoide. Martins et al. (2008) avaliaram a taxa de proliferação e apoptose por meio de análise imuno-histoquímica de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e por microscopia fluorescente com uso de isotiocianato, respectivamente. Foi observada uma maior proporção de núcleos positivos para PCNA quanto menos diferenciada a neoplasia. Embora o estudo tenha sugerido um corte de 60% de células PCNA-positivas para distinção entre tumores benignos e malignos, a classificação utilizada (proveniente de Berrocal et al. (1989)) é ambígua, não sendo possível descartar a possibilidade de que parte das neoplasias classificadas como “adenoma moderadamente diferenciado” e “adenoma pouco diferenciado” sejam, na verdade, neoplasias malignas de acordo com classificação da OMS (BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT, 1998; GROSS et al., 2005; MARTINS et al., 2008). A apoptose foi avaliada e a taxa de células apoptóticas foi maior nas neoplasias menos diferenciadas (MARTINS et al., 2008). Hung et al. (2000) também avaliaram a taxa de PCNA em tumores hepatoide, nos quais observaram diferenças significativas entre as categorias diagnósticas, com valores mais elevados para carcinomas de glândula hepatoide quando comparados aos adenoma e hiperplasias.

Alguns trabalhos têm avaliado também a marcação de AgNOR (identificação de regiões organizadoras nucleolares pela prata) em tumores de glândula hepatoide, e tem demonstrado maiores valores de AgNOR (contagem média de AgNOR por célula, área de AgNOR por célula, relação área AgNOR/área nuclear) em tumores malignos em comparação com lesões benignas. No entanto, os valores absolutos obtidos não são comparáveis entre os diferentes estudos, possivelmente por fatores técnicos da análise, e uma padronização e reavaliação da técnica, bem como determinação de pontos de corte seriam necessários para sua implementação prática como ferramenta para distinguir tumores benignos e malignos (HUNG et al., 2000; PREZIOSI et al., 1995).

A taxa de proliferação celular por Ki-67 foi avaliada por Pereira et al. (2013), e diferenças significativas foram demonstradas para os diferentes grupos diagnósticos, com valores médios de 1,7% para adenomas, 10,7% para epitelomas e 24,9% para carcinomas. Embora não tenha sido possível prever o comportamento biológico das neoplasias com base neste método de contagem (proporção de células neoplásicas positivas), uma abordagem alternativa, computadorizada, considerando a proporção de área nuclear

positiva, demonstrou poder preditivo de recorrência nos carcinomas (PEREIRA et al., 2013).

2.1.6 Tratamento

Diversos tratamentos têm sido preconizados para as neoplasias hepatoides. O estrógeno sintético dietilestilbestrol, administrado em altas doses, por via oral e subcutânea, foi utilizado para o tratamento destas neoplasias, bem como outras neoplasias ou doenças hormônio-dependentes, tais como prostatopatias e tumores mamários (SMYTHE, 1945; SMYTHE, 1946). Em tumores perianais ulcerados, este tratamento demonstrou regressão tumoral em um período que variou de 3 a 6 semanas. Já para tumores subcutâneos perianais não ulcerados, os resultados foram menos eficazes e nem sempre foi observada a resolução total da lesão (SMYTHE, 1946). No entanto, o diagnóstico nestes estudos foi baseado em aspectos clínico-macroscópicos, sem a investigação histopatológica, não sendo possível definir se estas lesões correspondem de fato a tumores hepatoides ou se correspondem a tumores de outras origens, como os adenocarcinomas de glândula do saco anal e sarcomas que, embora menos frequentes, também podem acometer esta região (BERROCAL et al., 1989; VICENTE; PERALES; TABACCHI, 2015)

Nestes relatos iniciais com o dietilestilbestrol, foram descritos alguns efeitos adversos, como poliúria e polidipsia, atrofia testicular, ginecomastia, lactação e hipotricose facial. Para animais senis, o uso prolongado por várias semanas pode levar a prostração e, raramente, óbito, sendo recomendado evitar a dose total para animais nestas condições (SMYTHE, 1946). De fato, uma consequência grave do uso terapêutico de derivados de estrógeno é a ocorrência da mielotoxicidade, podendo evoluir para uma supressão medular fatal, dependendo da idade do animal, tipo de estrógeno utilizado, dose total e condição física do paciente. Clinicamente, a toxicidade manifesta-se com sinais como depressão, mucosas pálidas, hemorragias petequiais e epistaxe uni ou bilateral, sinais que refletem uma falência medular. Embora a maioria dos casos de toxicidade tenham sido descritos em associação a superdosagens de estrógenos, este efeito pode ocorrer também em dosagens adequadas, mas em animais com sensibilidade idiosincrásica ou portadores de tumores produtores de estrógeno (SONTAS et al., 2009). Por este motivo, o uso de terapia estrogênica para tumores de glândula hepatoide é controverso e não recomendável, e outras abordagens mais seguras devem ser consideradas (RIVIERE;

PAPICH, 2018; GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992).

O uso de radioterapia com Raios-X também foi estudado para o tratamento de tumores perianais (THOM, 1950; MCCLELLAND, 1955). Com uma dosagem total que variou de 1000 a 4000 roentgens (divididos em doses fracionadas de 300 roentgens), foi obtida regressão tumoral completa, sem recidivas, em 54,7% dos casos. Recidivas foram observadas em outros 30,9% dos casos e atribuídas à radiação insuficiente, mas 61,5% destes casos recorrentes obtiveram remissão após novo tratamento, com uma dose total de 4000 roentgens (MCCLELLAND, 1955). Embora esta técnica demonstre uma eficácia considerável, deve-se considerar que uma importante desvantagem é a possibilidade de efeitos adversos advindos da radioterapia, sejam agudos ou a longo prazo. Anderson et al. (2002) avaliaram a ocorrência de complicações advindas de radioterapia em região pélvica no tratamento de uma série de lesões em cães e complicações importantes foram observadas. Agudamente, os autores observaram 14/16 (87,5%) animais com diarreia, dos quais 12 deles atribuídas à diarreia de intestino grosso/colite. Adicionalmente, também foram observados efeitos a longo prazo, sendo 9 cães com colite crônica como um efeito tardio e 3 cães com perfuração gastrointestinal (ANDERSON et al., 2002). Assim, especificamente para o tratamento de tumores hepatoides, é evidente que outras abordagens demonstram uma maior eficiência terapêutica e com menor risco para o paciente.

Para machos inteiros, a castração tem sido descrita como uma importante modalidade terapêutica para tumores hepatoides, demonstrando regressão tumoral na maioria dos casos, com uma taxa de recorrência estimada em 4,8% dos casos (WILSON; HAYES, 1979). Embora, em relatos iniciais, era manifestada a impressão de que apenas adenomas eram responsivos ao efeito terapêutico da castração, evidências mais recentes sugerem que ao menos parte dos carcinomas também podem se beneficiar desta abordagem (WILSON; HAYES, 1979; ASSUNÇÃO, 2003). A regressão do volume tumoral varia, na maioria dos casos, entre 42,3% a 95% do volume total, não havendo aparente diferença entre adenomas e carcinomas. Relata-se uma estagnação da regressão em um período que varia de 72 a 180 dias (ASSUNÇÃO, 2003).

A eletroquimioterapia também tem sido estudada como opção de tratamento para neoplasias hepatoides, com o uso de cisplatina e/ou bleomicina. Este tratamento tem demonstrando boa eficácia, com taxas de remissão completa variando de 41% a 88% dos casos, e remissão parcial em 7,7% a 41% dos casos (TOZON; SERSA; CEMAZAR, 2001; TOZON et al., 2005; SPUGNINI et al., 2007). Um destes estudos sugere uma maior eficácia terapêutica em tumores menores de 1 cm. Apesar de não estar claro quais variáveis estariam envolvidas nesta grande variação de resposta entre os estudos, fatores

como diferentes graus de diferenciação tumoral, drogas e dosagens utilizadas, assim como modificações da técnica e aparelhos poderiam justificar estas diferenças (TOZON et al., 2005). Excetuando-se alguns efeitos locais inerentes ao tratamento, como necrose tumoral e formação de crosta superficial, discreto edema e hiperemia em animais com tumores estadiados como T4, não foram relatados efeitos adversos locais ou sistêmicos clinicamente significativos (TOZON et al., 2005; SPUGNINI et al., 2007).

2.1.7 Fatores prognósticos

Metástases de carcinomas hepatoides são raramente relatadas, porém diversos sítios tem sido descritos como alvos de metástase, incluindo linfonodos (sublombares, ilíaco externo, mesentérico, pré-escapulares e axilares), região lombossacral, pulmão, fígado, pleura, pericárdio, coração, peritônio, rins e baço (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; WILSON; BROWN, 1964; ALEXANDER et al., 1976; HAYES; WILSON, 1977; SILVA, 2002; TUNC et al., 2014). Para o epiteloma de glândula hepatoide, embora seja considerado uma neoplasia de baixo grau de malignidade, ainda não foram relatados casos de metástase. Alguns levantamentos descrevem taxas de metástase variando de 8,1 a 20% dos casos diagnosticados como carcinomas (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; HAYES; WILSON, 1977; VAIL et al., 1990), mas ressalta-se que outros estudos não demonstraram desfecho semelhante. Berrocal et al. (1989) relataram recorrência em 26% dos casos classificados como “tumores hepatoides moderadamente ou pouco diferenciados”, os que corresponderiam às classificações de carcinoma e epiteloma utilizadas em outras referências. Neste estudo, nenhum dos casos apresentaram metástases, embora não tenham deixado claro o período total de seguimento dos pacientes. De maneira semelhante, Pereira et al. (2013) estudaram 15 epitelomas e 12 carcinomas de glândula hepatoide, e tampouco observaram ocorrências de metástases, apesar de 11 apresentarem recidivas.

Além desta variação importante nas prevalências descritas para metástases, o que prejudica, em certa medida, o valor da classificação diagnóstica dos tumores hepatoides, existe também uma dificuldade em prever quais casos terão maior propensão para progressão para metástase. Mesmo para tumores malignos com características morfológicas típicas de um tumor bem diferenciado, com baixo pleomorfismo celular ou com baixa atividade mitótica, há exemplos na literatura de progressão para doença metastática (WILSON; BROWN, 1964; ALEXANDER et al., 1976; TUNC et al., 2014).

2.1.8 O problema da variação de prevalência dos tumores hepatoídes

Ao comparar diversos levantamentos retrospectivos na literatura veterinária, fica evidente a grande variação encontrada nas proporções entre tumores de glândula hepatoide malignos e benignos. As prevalências de carcinomas de glândula hepatoide, em comparação ao total de tumores hepatoídes, variam de 3,3 a 54,5% em diversos levantamentos recuperados de literatura. O quadro 1 destaca as prevalências de carcinoma obtidas de uma variedade de levantamentos retrospectivos. Algumas hipóteses podem ser elaboradas para tentativa de justificar esta alta variação encontrada na literatura, e serão apresentadas a seguir.

A distribuição racial de uma determinada população é uma variável biológica que poderia explicar parte desta variação, já que algumas raças têm demonstrado uma predisposição maior para o desenvolvimento de tumores de glândula hepatoide. Assim, uma população com maior representação de raças predispostas aos carcinomas e epitelíomas, e/ou com menor representação de raças predispostas ao adenoma, tenderia a demonstrar maiores prevalências de neoplasias malignas. Algumas das raças descritas e suas respectivas razões de chance (OR) para a ocorrência de carcinomas, em comparação com o total de cães de outras raças, são as seguintes: bluetick coonhound (OR=21,6), pastor belga (OR=11), husky siberiano (OR=6,4 a 7,9), samoieda (5,4), malamute do Alasca (5,2 a 9,3) e buldogue (OR=5,7). Para a ocorrência de epitelíomas, as raças predispostas são: boiadeiro australiano (OR=13,8), samoieda (OR=10,1), cão esquimó (OR=5,2), husky siberiano (OR=4,0) e chow chow (OR=3,8). Para a ocorrência de adenomas, são elencadas as raças: husky siberiano (OR=3,9 a 4), samoieda (OR=3,3 a 3,5), braco alemão de pelo curto (OR=3,1), pequinês (OR=2,4), cocker spaniel (OR=1,9), vizsla (OR=1,8), spaniel bretão (OR=1,6), lhasa apso (OR=1,6), cockapoo (OR=1,6), shih tzu (OR=1,4) e beagle (OR=1,4) (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). No entanto, dentre os levantamentos que demonstraram as maiores proporções de carcinomas, a maioria não descreve a presença destas raças mais predispostas às neoplasias malignas (ROTHWELL et al., 1987; SILVA; PELETEIRO; CORREIA, 2002; MEIRELLES et al., 2010; ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN et al., 2013; FERNANDES et al., 2015), ou descrevem apenas algumas raças, mas com contribuição aparentemente pouco expressiva na população em estudo (ANDRADE et al., 2012; BHAIYAT et al., 2013). O levantamento de Vicente, Perales e Tabacchi (2015) se destaca dos demais por relatar as raças husky siberiano e samoieda como algumas das mais frequentes, além do cocker spaniel, e é possível que neste levantamento tenha havido uma

Quadro 1: Prevalências de carcinomas de glândula hepatoide com relação ao total de diagnósticos de tumores hepatoides em diversos levantamentos retrospectivos encontrados em literatura veterinária

Fonte	Carcinomas(%)	N total	Origem
Mulligan (1949)	26,4	68 ^a	Colorado, EUA
Nielson e Aftosmis (1964)	3,3	300 ^a	Ohio e Connecticut, EUA
Hayes e Wilson (1977)	18,3	472 ^a	EUA e Canada
Finnie e Bostock (1979)	19,4	103 ^a	Melbourne, Austrália
Rothwell et al. (1987)	43,1	88 ^a	Sydney, Austrália
Berrocal et al. (1989)	27,1	111 ^d	Utrecht, Holanda
Goldschmidt e Shofer (1992)	5,1	2845 ^a	Pensilvânia, EUA
Kaldrymidou et al. (2002)	5,6	18 ^a	Tessalônica, Grécia
Silva, Peleteiro e Correia (2002)	40,9	188 ^c	Lisboa, Portugal
Rungsipat et al. (2003)	9,3	128 ^a	Bangkok, Tailândia
Mukaratirwa et al. (2005)	13,3	45 ^a	Harare, Zimbábue
Souza et al. (2006)	42,1	76 ^a	Rio Grande do Sul, Brasil
Sharif (2006)	12	50 ^b	Giessen, Alemanha
Aleksić-Kovačević et al. (2005)	23,5	34 ^a	Belgrado, Sérvia
Pakhrin et al. (2007)	42,5	47 ^b	Seoul, Coreia do Sul
Meirelles et al. (2010)	43,7	128 ^b	Rio Grande do Sul, Brasil
Salvado (2010)	33,8	511 ^b	Lisboa, Portugal
Simeonov et al. (2011)	36,5	63 ^a	Stara Zagora, Bulgária
Kimura, Gárate e Dagli (2012)	31,8	66 ^a	São Paulo, Brasil
Andrade et al. (2012)	54,5	11 ^a	Paraíba, Brasil
Bhaiyat et al. (2013)	42,9	7 ^a	Granada
Šoštarić-Zuckermann et al. (2013)	53,6	97 ^a	Zagreb, Croácia
Vivero et al. (2013)	32	50 ^a	Lima, Peru
Fernandes et al. (2015)	53,1	32 ^a	Minas Gerais, Brasil
Vicente, Perales e Tabacchi (2015)	40	40 ^a	Lima, Peru
Tostes et al. (2017)	13,7	29 ^a	Paraná, Brasil

Fontes: indicadas na primeira coluna.

^a: - Contempla casos de adenoma e carcinoma de glândula hepatoide. ^b: - Contempla casos de adenoma, epitelioma e carcinoma de glândula hepatoide (epiteliomas foram mesclados com os carcinomas para o cálculo de prevalência). ^c: - Contempla casos de hiperplasia, adenoma e carcinoma de glândula hepatoide (hiperplasias foram mescladas com os adenomas para o cálculo de prevalência). ^d: - Classificação adaptada de Berrocal et al. (1989) (casos do Grupo II de Berrocal foram considerados carcinomas para o cálculo da prevalência).

influência do perfil racial na prevalência da malignidade, embora os autores não tenham especificado qual a contribuição de cada uma destas raças no total da população. Convém também ressaltar que muitos estudos têm avaliado predisposições raciais para tumores hepatoides em geral, não estratificando os achados para as diferentes classificações morfológicas (adenoma, carcinoma, epitelioma). Assim, a princípio, a influência dos diferentes perfis raciais na prevalência não pode ser completamente subestimada, restando desvendar quais outras raças estariam predispostas especificamente às variantes malignas dos tumores hepatoides.

Um fator técnico que poderia explicar esta variação diz respeito ao método de classificação utilizado. Diversos artigos e livros-texto têm descrito parâmetros

morfológicos para a classificação de tumores hepatoide, mas os critérios nem sempre são concordantes entre si. Por exemplo, anteriormente à introdução do diagnóstico de epiteloma de glândula hepatoide pela classificação da OMS, em 1998, casos com uma elevação da proporção de células de reserva ou intermediárias eram variavelmente classificadas como adenoma ou carcinoma (MULLIGAN, 1949; GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992). Adicionalmente, algumas descrições enfatizam o aspecto morfológico pouco diferenciado e pleomórfico dos carcinomas, pressupondo se tratar de uma característica *sine qua non*, em contradição com outras descrições, que enfatizam a ocorrência frequente dos carcinomas bem diferenciados, que podem se confundir com o adenoma (GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992; GOLDSCHMIDT, 1998; GROSS et al., 2005). Para obscurecer ainda mais a questão, Berrocal et al. (1989) interpretaram um grupo de 23 tumores de origem hepatoide como benignos, sub-classificando-os como “moderadamente diferenciados” ou “pouco diferenciados”, apesar de demonstrarem características histomorfológicas de malignidade, como bordos irregulares, moderada quantidade de figuras de mitose e necrose tumoral. Os autores respaldaram-se pela ausência de ocorrências de metástases no seguimento clínico dos 23 casos estudados. Esta classificação de Berrocal et al. (1989) tem sido reproduzida por outros autores, já após a introdução do epiteloma, mas com interpretação aparentemente discrepante do trabalho original (MARTINS et al., 2008; MARTINS et al., 2010). Mesmo após a incorporação do diagnóstico de epiteloma, as discordâncias persistem. Por exemplo, representações fotomicrográficas do epiteloma oriundas de diferentes autores demonstram uma aparente discrepância na proporção de células de reserva necessária para a caracterização do diagnóstico (GROSS et al., 2005; PEREIRA et al., 2013). Gross et al. (2005) abordaram esta problemática, e sugeriram um ponto de corte de 90% de proporção de células de reserva para o diagnóstico de epiteloma. Estas diferentes descrições oferecem a oportunidade de interpretações diversas por parte dos patologistas, podendo contribuir para a variação observada (Quadro 1). Finalmente, mesmo utilizando-se de uma mesma fonte de classificação morfológica, existe a possibilidade de uma variação interobservador importante que justifique estas variações de prevalência. A variação entre patologistas será tão maior quanto menos bem definidos estiverem os critérios de classificação de uma determinada lesão. Este fenômeno é bem conhecido na anatomia patológica e será apresentada em maiores detalhes na seção seguinte.

2.2 A REPRODUTIBILIDADE NA PATOLOGIA

2.2.1 Processos individuais, formais e normativos envolvidos no diagnóstico anatomopatológico

A reprodutibilidade diagnóstica na patologia pode ser categorizada em três níveis: a reprodutibilidade individual (epistemológica), a reprodutibilidade formal/tecnológica, e a reprodutibilidade normativa. A reprodutibilidade individual diz respeito aos processos cognitivos envolvidos tanto na obtenção de dados pelo patologista, como informações clínicas, dados visuais oriundos de análise de lâminas histopatológicas, dados de exames complementares adicionais, quanto na integração destes dados e posterior elaboração de uma interpretação diagnóstica. A reprodutibilidade formal/tecnológica está associada a padronizações de tecnologias e processos envolvidos em diagnóstico anatomo-patológico, com por exemplo padrões para o processamento de amostras, fixação, inclusão em parafina, microtomia, coloração de lâminas, etc. Por fim, a reprodutibilidade normativa diz respeito a acordos nacionais ou internacionais envolvidos na atividade, como diretrizes diagnósticas obtidas em consensos, expectativas acerca de implicações ético-legais da atividade, códigos sociais de conduta, entre outros (POSPISCHIL; FOLKERS, 2015). Para melhor compreender os possíveis fatores envolvidos em situações de discordância diagnóstica entre patologistas, se faz necessária uma compreensão detalhada destes níveis de reprodutibilidade, especialmente aqueles de ordem individual/epistemológica e normativa.

Embora utilizada exaustivamente em literatura científica como técnica diagnóstica, há poucas referências discutindo acerca dos processos cognitivos envolvidos em análise anatomopatológica. A compreensão mais detalhada deste processo é importante para poder delinear possíveis estratégias para aprimorar o diagnóstico patológico, bem como aprimorar o processo de seleção e motivação de estudantes interessados na área de patologia, ao definir quais são as características esperadas para um bom patologista (BUSSOLATI, 2006). Os patologistas se utilizam de processos cognitivos, como percepção, atenção, memória e investigação, em um processo com controle consciente (função metacognitiva). De modo geral, uma ou mais estratégias podem ser utilizadas pelos patologistas para a conclusão diagnóstica. No processo de reconhecimento de padrões, o diagnóstico é obtido pela percepção de que a imagem observada coincide com uma imagem anteriormente aprendida de determinada doença

(e dependente, portanto, da memória e experiência do patologista). No processo de ramificação múltipla ou arborização (algoritmos), o diagnóstico é submetido a uma série de etapas pré-estabelecidas, de modo que cada resposta a uma indagação diagnóstica gera automaticamente uma próxima indagação, culminando eventualmente no diagnóstico correto. Na estratégia exaustiva, mais tipicamente utilizada por patologistas pouco experientes ou para casos raros/pouco usuais, todos os dados possíveis e disponíveis são coletados (como exames complementares, exames de imagem, colorações especiais, exames imuno-histoquímicos, etc.), para que posteriormente seja obtido o diagnóstico. Por fim, na estratégia hipotética e dedutiva, o patologista desenvolve uma pequena lista de diagnósticos diferenciais a partir de indícios obtidos de exame anatomopatológico, a ser reduzida posteriormente com análise de exames complementares (ex.: colorações especiais, exame imuno-histoquímicos) ou com um maior detalhamento de análise anatomopatológica (é um processo contínuo de criação e verificação de hipótese) (PENA; ANDRADE-FILHO, 2009).

Para além da questão cognitiva, outros domínios também fazem parte da atividade diagnóstica, e podem ter importância na introdução de variações. O domínio comunicativo diz respeito não apenas à redação do relatório, mas também à consideração de justificativas para determinada interpretação, embasadas em achados anatomopatológicos e apoiadas por literatura pertinente, bem como a consideração de possíveis constatações desta interpretação (PENA; ANDRADE-FILHO, 2009). O grau de certeza diagnóstica, baseado nestas justificativas, é geralmente aferido pelo patologista e comunicado em relatório com o uso de modificadores de certeza diagnóstica ou notas (CHRISTOPHER; HOTZ, 2004; PENA; ANDRADE-FILHO, 2009; LINDLEY; GILLIES; HASSELL, 2014; BRACAMONTE et al., 2016). No domínio normativo, o patologista atua de acordo com processos racionais de tomada de decisão (baseadas em conhecimento analítico), e também de acordo com normas sociais, ao considerar expectativas recíprocas da relação clínico-patologista, bem como a adesão de regras/consensos de graduação, estadiamento e padronização de laudos (PENA; ANDRADE-FILHO, 2009). Por fim, no domínio da conduta médica, o patologista se responsabiliza tecnicamente pelo relatório, e deve considerar o impacto que a decisão por um determinado diagnóstico terá para o paciente, e julga em que situações se fará necessária a obtenção de maior amostragem, secções ou testes adicionais, segunda opinião, entre outras medidas (PENA; ANDRADE-FILHO, 2009).

As variações de opinião diagnóstica podem ser explicadas por variação entre os classificadores (patologistas), variação entre os classificados (amostras/casos), ou problemas no uso de sistemas e métodos de classificação (FOUCAR, 2000). Embora a

busca por um sistema de classificação que minimize as variações de diagnóstico entre patologistas e casos, e que ofereça uma informação de valor para o clínico, seja um norte a ser perseguido na patologia, não é uma expectativa realista a busca de um sistema de classificação totalmente imune a discordâncias (FOUCAR, 2000). Dentro da prática diagnóstica, sempre ocorrerão instâncias denominadas de 'casos problema', que não poderão ser resolvidos nem por meio de obtenção de maiores informações do caso (ex.: dados clínicos, testes complementares), nem por consulta a opinião de especialistas (HENDRICKSON, 2011).

Ao criar sistemas classificatórios, busca-se encaixar realidades oncológicas altamente complexas dentro de categorias diagnósticas bem definidas que possam ser replicadas pelos patologistas. Esta alta complexidade pode ser discutida tanto do ponto de vista da neoplasia individual, quanto do ponto de vista do grupo de neoplasias participantes de uma mesma classificação diagnóstica (HENDRICKSON, 2011). Uma neoplasia individual possui complexidade (1) celular, explicada pela presença de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos níveis de controle celular; (2) complexidade tecidual, havendo participação do estroma, vascularização, infiltração de macrófagos, e mioepitélio na modulação da progressão tumoral, criando um sistema microecológico (associação de células tumorais com microambiente); (3) complexidade macroscópica, de ordem evolutiva: no momento de detecção de uma formação tumoral, já houve ao menos 30 replicações e a neoplasia consiste de bilhões de células ou mais, e caracteriza-se por um complexo de múltiplas microecologias. Assim, cada neoplasia individual é única, tal qual impressões digitais, e o comportamento biológico de neoplasias semelhantes admitirá apenas formulações estatísticas (HENDRICKSON, 2011).

Com relação às neoplasias como um grupo, deve-se considerar que o diagnóstico obtido é uma função entre o valor diagnóstico dos dados obtidos do paciente, e a robustez da categoria diagnóstica em que o caso pode ser enquadrado (FOUCAR, 2001). Emprestando o argumento do biólogo evolucionista Stephen Jay Gould sobre a plausibilidade de surgimento de uma nova vida inteligente na história do planeta, a partir de diversas repetições do processo evolutivo a partir de um ponto inicial temporal comum, Hendrickson (2011) conceitualiza o mesmo processo para classificações neoplásicas, ao considerar que cada neoplasia individual corresponde a uma trajetória evolutiva própria (cada clone celular tumoral corresponderia a uma espécie individual). Assim, com base neste modelo, ao se classificar uma série de casos de uma mesma histogênese, de acordo com determinados critérios, se obtém um agrupamento (*clustering*) de casos típicos e inequívocos (*core*), uma margem menos concentrada de casos atípicos (penumbra), e casos mais distantes que se tornam casos problemáticos do ponto de vista diagnóstico (*terra*

Figura 1: Sistema de aglomerações CoPeTi proposto por Hendrickson (2011) no contexto de patologia diagnóstica

Fonte: (HENDRICKSON, 2011)

a figura demonstra um corte bidimensional feito a partir de um espaço tridimensional contemplando diversas curvas uni ou multimodais representativas da variabilidade biológica de determinado processo. Ao centro, os casos *core* representam os casos típicos de determinado sistema de classificação, enquanto que os casos mais periféricos (*penumbra*) representam casos menos típicos, ao passo que os mais distantes (*terra incognita*) consistem de casos desconhecidos/inclassificáveis.

incognita) (Figura 1). Uma característica importante destes agrupamentos, que nos faz entender a dificuldade de se obter uma classificação precisa, é o fato de seus limites não poderem ser definidos com precisão (indeterminação de extensão), e qualquer tentativa de se particionar este espaço irá falhar em casos limítrofes (HENDRICKSON, 2011).

2.2.2 Métodos de avaliação da concordância em anatomia patológica

A investigação de discordâncias em anatomia patológica é frequentemente avaliada por meio de índices que corrigem para concordâncias que podem advir do acaso, ao invés da mera concordância percentual. Alguns dos métodos mais utilizados incluem o κ de Cohen (1960) e o coeficiente de correlação intraclasse de Shrout e Fleiss (1979) (ICC). A vantagem de se utilizar estes métodos, ao invés da mera concordância percentual, fica clara ao considerarmos um exemplo de dois juízes que devem atribuir o resultado de um lançamento de uma moeda, com a diferença de que apenas um deles deve emitir seu julgamento antes do lançamento da moeda (ou seja, fazer uma previsão). Nesta situação, a concordância percentual seria algo próxima dos 50%, enquanto que a concordância por meio do método de κ seria algo próxima do zero, por corrigir os acertos ao acaso. Por este motivo, tem sido recomendada a utilização destes métodos para se avaliar concordância

Quadro 2: Diretrizes para interpretação de κ de acordo com Landis e Koch (1977)

valor de κ	força de concordância
<0	Ruim
0-0,2	Fraca
0,21-0,4	Razoável
0,41-0,6	Moderada
0,61-0,8	Substancial
0,81-1	Quase perfeita

Fonte: (LANDIS; KOCH, 1977)

Quadro 3: Diretrizes para interpretação de κ e ICC de acordo com Cicchetti e Sparrow (1981 apud CICCHETTI, 1994)

valor de κ ou ICC	força de concordância
<0,4	Ruim
0,4-0,59	Razoável
0,6-0,74	Boa
0,75-1	Excelente

Fonte: (CICCHETTI; SPARROW, 1981 apud CICCHETTI, 1994)

entre observadores. No entanto, o uso desta abordagem tem sido questionado, já que os valores obtidos de κ podem diminuir excessivamente a estimativa de concordância entre os avaliadores, e índices baixos de concordância tem sido portanto considerados aceitáveis por pesquisadores (MCHUGH, 2012). McHugh (2012) sugere que sejam relatadas tanto a concordância percentual quanto o coeficiente de κ . De fato, não há um consenso sobre como se deve dar a interpretação destes índices, nem tampouco sobre qual valor devemos almejar dentro de uma realidade diagnóstica. Algumas diretrizes para a interpretação de resultados de concordância por meio de análise de κ de Cohen e ICC têm sido descritas na literatura. Landis e Koch (1977) propuseram uma escala de interpretação de resultados de valores de κ , embora tenham especificado se tratar de uma escala 'claramente arbitrária' (Quadro 2). Da mesma maneira, Cicchetti e Sparrow (1981 apud CICCHETTI, 1994) sugeriram diretrizes para interpretação tanto de valores de κ (ponderado e não ponderado) quanto para valores de ICC (Quadro 3). Especificamente na área de anatomia patológica, Nakhleh (2015) sugere que a reprodutibilidade dentro de um sistema de classificação deve ser sempre investigada, e que um valor κ de 0,4 a 0,6 é geralmente aceito na maioria dos sistemas.

2.2.3 Estudos de concordância diagnóstica em patologia veterinária

Em patologia veterinária, alguns estudos tem avaliado a concordância diagnóstica entre patologistas para algumas doenças neoplásicas. O uso de diferentes técnicas de avaliação de concordância entre os diferentes estudos dificulta uma comparação direta entre eles, mas alguns comentários são válidos para uma compreensão da situação atual na oncopatologia diagnóstica veterinária. Na aplicação da graduação de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984) para mastocitomas cutâneos caninos, há um grau de concordância interobservador moderado a substancial: κ ponderado de 0,62 em estudo de Northrup et al. (2005), e concordância percentual de 64,1% em estudo de Kiupel et al. (2011). A nova graduação em duas categorias, proposta por Kiupel et al. (2011), obteve uma concordância percentual maior, de 99,3%, e manteve seu valor de predição de características prognósticas. Para sarcomas de tecidos moles, Yap et al. (2017) relataram um bom grau de concordância interobservador quanto ao diagnóstico ($\kappa=0,60$) e razoável quanto à graduação ($\kappa=0,43$), embora tenha sido observado uma concordância intraobservador excelente para a graduação ($\kappa=0,91$). Quanto aos critérios morfológicos utilizados na graduação, avaliados por coeficiente de correlação intraclass (ICC), os valores obtidos foram de 0,46 para necrose, 0,57 para índice mitótico, e 0,11 para grau de diferenciação. O escore total, definidor da graduação dos sarcomas de partes moles, demonstrou concordância ruim (ICC=0,2). Grimes et al. (2017) relataram um grau ruim de concordância ($\kappa=0,18$) para o diagnóstico de melanoma metastático em linfonodo em exame histopatológico, embora o segundo observador tenha se beneficiado de técnicas complementares adicionais, como coloração especial para detecção de ferro e exame imuno-histoquímico para Melan A. Quanto ao diagnóstico citopatológico, foi descrita uma concordância interobservador de 0,24 (κ ponderado), considerando 3 categorias diagnósticas (positivo, negativo ou equívoco). Em estudo de avaliação de concordância em amostras de amputação de dígito em cães e gatos, houve 15% de casos discordantes considerados como clinicamente significativos (ex.: discordância quanto à malignidade), e a dificuldade técnica de se analisar amostras de dígitos, considerando a complexidade de estruturas teciduais da região e dificuldades de processamento, foi interpretada como fator contributivo desta discrepância (WOBESER et al., 2007).

Regan et al. (2010) avaliaram o impacto da segunda opinião diagnóstica em casos de lesões neoplásicas em cães e gatos, e discordâncias clinicamente significativas foram observadas em 17% dos casos. Houve pequeno valor prognóstico ao instituir a segunda opinião, já que de 13 casos discordantes com seguimento disponíveis, 9 casos

demonstraram evolução clínica mais compatível com o diagnóstico de segunda opinião, enquanto 4 casos tiveram seus diagnósticos originais mais suportados pela evolução clínica. Estes achados indicam que existe um potencial significativo de impacto clínico em casos de discordância entre patologistas, e os autores discutem como possíveis causas o uso de métodos subjetivos ou diferentes esquemas de graduação, indisponibilidade de dados clínicos, terminologias não uniformes e diferentes níveis de experiência entre os observadores (REGAN et al., 2010).

2.2.4 Reprodutibilidade do diagnóstico das neoplasias hepatoides

Alguns autores tem manifestado a percepção de que a discrepância entre prevalências de carcinoma hepatoide entre diferentes estudos podem corresponder ao uso de diferentes critérios para definição de malignidade nestas neoplasias, mas a concordância entre observadores não tem sido muito estudada em literatura para esta neoplasia (GROSS et al., 2005). Ganguly e Wolfe (2006) relataram, em um levantamento de 44 casos de tumores hepatoides, avaliados por dois patologistas, uma discrepância diagnóstica em 8 casos (18%), mas o índice de concordância de κ não foi calculado.

2.3 A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E SUA PARTICIPAÇÃO NA ONCOGÊNESE

Uma das características mais marcantes dos tumores malignos, que os diferenciam dos tumores benignos e de processos hiperplásicos, é a capacidade das células neoplásicas demonstrarem comportamento invasivo, critério essencial para o desencadeamento da cascata de metástase. Este processo permite que as células neoplásicas infiltrem-se em estroma tumoral, alcancem vasculatura local (intravasamento), se disseminem e, ao interagir com células endoteliais em órgão alvo, possam penetrar em tecido (extravasamento), com posterior colonização e expansão associadas ao aproveitamento do microambiente local (KUMAR et al., 2015). Para neoplasias epiteliais, o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) tem sido proposto como um processo importante para a aquisição deste fenótipo invasivo. A EMT caracteriza-se pela perda da expressão

de proteínas associadas à diferenciação epitelial, especialmente aquelas envolvidas na manutenção de polaridade apico-basal e junção celular, como a E-caderina e integrinas, além de filamentos intermediários associados à diferenciação epitelial, como as citoqueratinas, e ganho de expressão de proteínas associadas à diferenciação mesenquimal, como a vimentina e actina de músculo liso. Esta alteração de perfil permitiria uma maior versatilidade e flexibilidade celular, assim como aquisição de um fenótipo migratório por parte das células neoplásicas, possibilitando demonstrar este comportamento invasivo (KUMAR et al., 2015).

Pioneira no estudo da EMT, a bióloga Elizabeth Dexter Hay investigou este fenômeno no contexto da embriogênese, demonstrando sua ocorrência na gastrulação em embriões de galinha, com a transformação de células epiteliais do epiblasto em células mesenquimais primárias para posterior formação do mesoderma e hipoderma (TRELSTAD; HAY; REVEL, 1967; HAY, 1995). Entre outros estudos, demonstrou também a transformação de células epiteliais em células mesenquimais durante a fusão palatina em camundongos (GRIFFITH; HAY, 1992). Nestes estudos iniciais, a transição era apreciada à microscopia eletrônica, e o fenótipo mesenquimal era definido como células demonstrando aspecto estrelado/bipolar, com presença de pseudópodes ou filopódios, e ausência de junções de células epiteliais, como desmossomos (TRELSTAD; HAY; REVEL, 1967; GRIFFITH; HAY, 1992). O processo era referido à época como transformação epitélio-mesenquimal, mas uma diversidade de terminologias passou a ser posteriormente empregada para denominar o mesmo evento, como transdiferenciação epitélio-mesenquimal, interações epitélio-mesenquimais e transição epitélio-mesenquimal, entre outras, inserindo uma boa dose de dissonância na literatura. Kalluri e Neilson (2003) sugerem a adoção do termo transição epitélio-mesenquimal, em detrimento de outros termos utilizados à época, como o mais representativo deste processo. A escolha é justificada, já que o termo transformação se refere tradicionalmente a uma conversão neoplásica de epitélio (ex.: transformação maligna) e o termo interação se refere a uma comunicação parácrina entre epitélio e estroma (não pressupondo uma alteração de fenótipo celular neste processo). Embora reconheçam que a EMT possa ser considerada uma variante de transdiferenciação, manifestam preferência pelo termo transição, já que a transdiferenciação é utilizada classicamente para se referir a alteração de uma célula diferenciada para outra célula também diferenciada (ex.: conversão de tecido adiposo marrom para tecido adiposo branco, conversão de epitélio pigmentado de retina em epitélio de cristalino)(KALLURI; NEILSON, 2003). O termo transição epitélio-mesenquimal tem sido utilizado desde então de maneira relativamente consistente.

A EMT tem sido classificada em 3 tipos. A EMT do tipo 1 consiste na ocorrência do processo no contexto da embriogênese e organogênese. O processo é descrito desde a etapa de implantação do embrião e formação da placenta humana, com a ocorrência de EMT em células trofoblásticas fetais que se infiltram em estroma endometrial (VÍCOVAC; APLIN, 1996; KALLURI; WEINBERG, 2009). Além da ocorrência de EMT na gastrulação, como já mencionado (TRELSTAD; HAY; REVEL, 1967), é possível destacar também a ocorrência de EMT na migração de células de crista neural após o fechamento do tubo neural, que irão migrar para diversos sítios do embrião, originando variados tipos celulares, como neurônios entéricos, simpáticos e sensoriais, melanócitos, músculo liso, derme, septo cardíaco, dentre outros (KALLURI; WEINBERG, 2009; BRONNER, 2012). A EMT do tipo 2 se refere ao evento associado à inflamação, regeneração e reparação tecidual, que se encerra após a resolução do processo inflamatório (KALLURI; WEINBERG, 2009). A fibrose renal é um exemplo deste processo, na qual estima-se que cerca de 5% dos miofibroblastos intersticiais originam-se de epitélio renal tubular por meio de EMT, e outros 10% originam-se de células endoteliais (por meio de processo conhecido como transição endotélio-mesenquimal) (LEBLEU et al., 2013). De maneira semelhante, a transição endotélio-mesenquimal induzida por TGF- β 1 contribui para a progressão da fibrose cardíaca (ZEISBERG et al., 2007). Finalmente, a EMT do tipo 3 faz referência ao evento em processos neoplásicos epiteliais, sendo decorrente de alterações celulares genéticas e/ou epigenéticas que permitem variados graus de EMT, e tem sido proposto como um mecanismo crítico para aquisição do fenótipo maligno em cânceres epiteliais (KALLURI; WEINBERG, 2009).

A compreensão do processo de EMT exige que se compreenda os fatores que definem o que é uma célula epitelial, e o que é uma célula mesenquimal. O epitélio pode ser definido como uma coleção de células que formam um manto ou uma camada relativamente delgada devido a adesões mútuas celulares, com polarização celular e formação de porção apical e porção basal (polaridade apicobasal) (THOMPSON; NEWGREEN; TARIN, 2005). Esta estrutura envolve a participação de pontos de adesão com matriz extracelular/membrana basal (envolvendo complexos de integrinas), polarização de citoesqueleto de actina, filamentos intermediários de citoqueratinas e participação de membros das caderinas na adesão celular. Em contrapartida, as células mesenquimais formam uma rede tecidual relativamente difusa, não havendo camada celular completa, e as células apresentam adesões apenas pontuais com células vizinhas, e pontos de adesão com matriz extracelular estão distribuídos por toda a célula. O citoesqueleto de actina não demonstra mais polaridade apicobasal, mas sim uma rede cortical e transcitoplasmática de feixes de actina (polaridade do tipo *front-back*)

(THOMPSON; NEWGREEN; TARIN, 2005).

A E-caderina é um dos marcadores epiteliais frequentemente investigados em processos neoplásicos no contexto da EMT. A E-caderina é uma dentre uma família de glicoproteínas associadas à membrana que mediam junções celulares por meio de ligações dependentes de Ca^{2+} , associadas a junções aderentes e ocludentes, e é expressada em todas as células epiteliais de mamíferos (LIEN; KLEZOVITCH; VASIOUKHIN, 2006; ROY; BERX, 2008). A E-caderina possui 120kD, e consiste de um domínio transmembrana único, um domínio citoplasmático de cerca de 150 aminoácidos, e um ectodomínio de cerca de 550 aminoácidos (ROY; BERX, 2008). A sua associação com as cateninas, nos chamados complexos de caderina-catenina, é essencial para sua ligação com o citoesqueleto de actina e preservação da polaridade celular (LIEN; KLEZOVITCH; VASIOUKHIN, 2006).

A vimentina é uma dentre 4 proteínas classificadas como proteínas de filamento intermediário do tipo III, e está amplamente distribuída. Ela é expressa principalmente em células indiferenciadas e proliferativas e em células derivadas de mesênquima (HOL; CAPETANAKI, 2017). A vimentina tem participação nos processos de cicatrização tecidual, adesão linfocitária e migração transcelular (HOL; CAPETANAKI, 2017).

Hay (2005) reconhece a dificuldade em se caracterizar uma transformação mesenquimal, por não haver marcadores bioquímicos específicos para a detecção de célula mesenquimal. A própria vimentina é encontrada, por exemplo, em epitélio de cristalino e outros epitélios oculares, e actina e fibronectina também são pouco específicos, e podem ser produzidas por epitélio. Assim, sugere que a definição deve advir de características morfológicas e de motilidade, definindo a célula mesenquimal como demonstrando polaridade *frontend-backend*, morfologia alongada, presença de filopódios e motilidade invasiva (HAY, 2005). Ainda, alguns autores tem enfatizado que os estados de mesênquima e epitélio são melhor compreendidos como estados celulares, e não como linhagens (THOMPSON; NEWGREEN; TARIN, 2005).

Dentre vários agentes sinalizadores, o TGF- β desempenha um papel importante na EMT nos carcinomas. Embora exerça efeito supressor de proliferação epitelial em fases iniciais de tumorigênese, o TGF- β pode, em fases mais avançadas, exercer atividade promotora tumoral, e contribuir para a aquisição de fenótipo metastático. Ao se ligar em seus receptores, o TGF- β inicia uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição ligados à EMT. Algumas das vias ativadas pelo TGF- β incluem a via NF- $\kappa\beta$, PI3K/AKT, quinase ligada a integrina, Map quinase e família Rho das GTPases. O estímulo para a indução de EMT pode ser de ordem extrínseca, oriunda de agentes presentes no microambiente tumoral, e também de ordem intrínseca, decorrente de

alterações genéticas ou epigenéticas que potenciam indutores ou reprimem supressores da EMT. Além do TGF- β , outros agentes estão também envolvidos na EMT, como ativadores de Wnt, Hedgehog, Notch, dentre outros. A ativação destas vias culmina invariavelmente na ativação de um ou mais fatores de transcrição que, ao suprimirem a expressão de E-caderina, desempenham um papel essencial na EMT, como os fatores da família Snail (Snail e Slug), fatores da família das proteínas HLH (Twist) e fatores da família das proteínas ligadoras de dedo de zinco E-box (ZEB1, ZEB2) (CERVANTES-ARIAS; PANG; ARGYLE, 2013). A perda da expressão de E-caderina, por sua vez, está associada a perturbação do complexo E-caderina/ β -catenina, com translocação de β -catenina para o núcleo e posterior ativação de vias promotoras de proliferação celular (KUMAR et al., 2015). Além de ser suprimida por meio dos fatores de transcrição supracitados, a expressão de E-caderina pode ser diminuída também em decorrência de mutações com perda de função em *CDH1* (cadherin 1), gene responsável por sua codificação (KUMAR et al., 2015). Mutações germinativas no gene *CDH1* estão associadas, por exemplo, à ocorrência de carcinomas gástricos e mamários em humanos (PHAROAH; GUILFORD; CALDAS, 2001).

Um paralelo entre a teoria da EMT e a teoria das células tronco tumorais tem sido proposto em literatura. De acordo com a teoria das células tronco tumorais, existe, em uma dada neoplasia, uma população de células tronco capaz de originar uma população tumoral heterogênea. Estas células, denominadas de células iniciadoras tumorais, podem ser caracterizadas de acordo com seus marcadores de superfície celular (ex.: células CD34⁺ e CD38⁻ em leucemia mielógena aguda em humanos) (LAPIDOT et al., 1994; CERVANTES-ARIAS; PANG; ARGYLE, 2013). Células neoplásicas submetidas ao processo de EMT tem demonstrado a capacidade de gerar células tronco tumorais, sugerindo que a EMT é um processo importante não apenas para aquisição do fenótipo invasivo, mas também para a manutenção de população de células iniciadoras. Pang et al. (2011) demonstraram, em ensaio de cultura celular, uma maior capacidade de formação de esferas tumorais (uma característica de células tronco tumorais) por células do carcinoma mamário canino ao serem submetidas à EMT por meio de indução por TGF- β . Demonstraram também que estas células tronco tumorais expressam marcadores mesenquimais e possuem maior capacidade de invasão que células parentais. Compreender a associação de EMT com a formação de células tronco tumorais pode auxiliar no desenho de estratégias terapêuticas que visem a eliminar a ocorrência de EMT (tentando, por exemplo, inibir a ação de TGF- β ou fatores de transcrição) e, consequentemente, diminuir a carga de células tronco tumorais, já que estas tendem a ser mais resistentes ao tratamento convencional (CERVANTES-ARIAS; PANG; ARGYLE,

2013)

A EMT explica a transição de células epiteliais neoplásicas em células mesenquimais para a obtenção da capacidade de invasão estromal e, posteriormente, invasão vascular (intravasamento). No entanto, é notório que lesões metastáticas frequentemente se assemelham morfológicamente às suas respectivas lesões primárias, incluindo o aspecto epitelióide das células neoplásicas (KALLURI; WEINBERG, 2009). Para explicar a colonização e metastatização, o mecanismo reverso de transição mesênquima-epitelial (MET, do inglês *mesenchymal-epithelial transition*) tem sido proposto como um fator importante para a manutenção da morfologia tumoral (KALLURI; WEINBERG, 2009). A ocorrência da MET pressupõe que a EMT seja um evento transitório e reversível, e que as características identificadoras da origem celular (epitelial) sejam preservadas durante a transição. Na MET, a expressão de proteínas de adesão celular, como a E-caderina e β -catenina, voltam a ocorrer, assim como a expressão de proteínas associadas à diferenciação mesenquimal (ex.: vimentina, fibronectina) voltam a ser reprimidas, culminando em uma retomada da polaridade apicobasal de células neoplásicas e sua capacidade de adesão (CERVANTES-ARIAS; PANG; ARGYLE, 2013). Alguns estudos tem avaliado esta teoria em ensaios de cultura celular e em modelos experimentais. Chaffer et al. (2006) demonstraram que células do carcinoma de células transicionais com fenótipo mesenquimal (linhagem celular TSU-Pr1) exibem menor potencial de colonização metastática após inoculação intracardíaca em camundongos (isto é, em espaço intravascular), em comparação com variantes celulares com fenótipo epitelial (TSU-Pr1-B1 e TSU-Pr1-B2), sugerindo que, uma vez atingindo a circulação, o fenótipo epitelial é mais favorável para o estabelecimento da metástase. Em ensaio de cultura celular com linhagens celulares oriundas de carcinoma ovariano, Chen et al. (2011) demonstraram que a superexpressão de miR-429 pode ter importância no processo de MET, ao induzir morfologia epitelial em células previamente com aspecto mesenquimal, além de induzir a repressão de genes associados a marcadores mesenquimais (como ZEB1 e VCAN) e superexpressão de genes associados a marcadores epiteliais, como CAV2 (caveolina 2) e DSP (desmoplaquina).

2.3.1 Contestações acerca da teoria da transição epitélio-mesenquimal

A EMT como justificativa do processo de invasão e metástase não é aceita de maneira unânime. Tarin, Thompson e Newgreen (2005) sugerem que a teoria

da EMT é uma falácia, e que não deve ser utilizada para compreender o processo de invasão e metástase. De acordo com estes autores, as evidências de EMT na literatura são oriundas principalmente de estudos *in vitro*, em um ambiente altamente artificial (bi ou tridimensional) e que não mimetiza as contribuições de natureza vascular, endócrina ou neurológica observadas *in vivo*. Ainda, entendem que as definições do que de fato caracteriza a EMT não são precisas e que a identificação de linhagem celular em estudos *in vitro*, mesmo quando da utilização de marcadores moleculares, é demasiadamente subjetiva e pouco confiável. A mera expressão de um determinado marcador (supostamente indicador de origem mesenquimal, como FSP1) não pode ser encarada como uma reprogramação genética da linhagem celular, e pode simplesmente indicar uma expressão aberrante por parte de células neoplásicas. O argumento mais enfático de Tarin, Thompson e Newgreen (2005) é o fato da EMT ser um evento praticamente inexistente aos olhos de um anatomopatologista e, como regra, não se observa a conversão de uma linhagem celular para outra em amostras de lesões neoplásicas epiteliais, e nem tampouco este critério é utilizado para graduação, estadiamento e prognóstico do câncer. Mesmo quando são observadas células neoplásicas isoladas, infiltrativas, raramente se tem dificuldade de se identificar a célula como de origem epitelial (mesmo quando demonstram aspecto fusocelular). Acrescenta que os casos de carcinosarcomas demonstram de fato malignidade epitelial e mesenquimal inequívoca, mas são demasiados raros para justificarem um processo supostamente essencial para o processo de invasão/metástase.

Klymkowsky e Savagner (2009), ao reconhecerem as limitações da teoria da EMT, sugerem que na maioria dos casos é mais apropriado se referir a um fenótipo EMT-símile, não pressupondo necessariamente a aquisição de uma transdiferenciação completa em célula mesenquimal, e enfatizando a possibilidade de um fenótipo mesenquimal intermediário. Ao invés da expressão de marcadores mesenquimais estarem indicando uma transição de fenótipo, os autores aventam a possibilidade de que esta expressão esteja representando uma falha na diferenciação celular normal. Os autores propõem também que variados tipos de tumores demonstram variados graus de fenótipo EMT-símile, e sugerem uma graduação para avaliação deste processo.

2.3.2 A transição epitélio-mesenquimal na oncologia veterinária

Na medicina veterinária, diversos estudos tem demonstrado evidências da participação do mecanismo de EMT em variados processos neoplásicos, e uma maior ênfase tem sido dada nas neoplasias mamárias.

Para tumores mamários caninos, a perda de expressão de E-caderina (ou expressão em domínio citoplasmático), bem como a perda de expressão de β -catenina tem demonstrado consistentemente correlação com critérios morfológicos associados a maior agressividade tumoral, como presença de invasão estromal, invasão vascular, maior grau histológico e metástase regional (SARLI et al., 2004; BRUNETTI et al., 2005; MATOS et al., 2006; GAMA et al., 2008). Uma correlação positiva entre a expressão de E-caderina e β -catenina tem também sido demonstrada (BRUNETTI et al., 2005; GAMA et al., 2008), indicando que ambas as moléculas participam conjuntamente do processo de EMT. A associação entre a perda da expressão destas proteínas e uma maior atividade proliferativa ainda precisa ser melhor investigada, já que resultados discrepantes tem sido relatados. Gama et al. (2008) demonstraram correlação negativa entre a expressão de E-caderina e β -catenina e contagem de mitoses, enquanto que Brunetti et al. (2005) não encontraram correlações ao comparar o grau de expressão destas proteínas com o número de células ki-67+, contagem de mitoses e índice AgNOR. A expressão de vimentina em neoplasias mamárias tem também demonstrado correlação com grau tumoral, invasão vascular, contagem de células positivas para ki-67+ e angiogênese (RISMANCHI et al., 2014). Outros estudos têm investigado também a expressão de fatores de transcrição associados à EMT, embora com resultados menos substanciais: Im et al. (2012) demonstraram uma maior expressão de Snail nos carcinomas, em comparação com adenomas, e dentre os carcinomas observaram também maior expressão em casos com invasão vascular e com maior grau histológico. No entanto, não foi encontrada uma correlação com o grau de expressão de E-caderina. Gamba et al. (2015) avaliaram uma série de fatores de transcrição em carcinomas mamários micropapilares invasivos (Zeb1, Zeb2, Snail, Twist), porém, de modo geral, encontraram uma diminuição da expressão destas proteínas em áreas invasivas da neoplasia em comparação com áreas de carcinoma *in situ*, contrariamente ao que seria esperado para o processo de EMT. Além disso, encontraram apenas uma fraca correlação negativa entre a expressão de E-caderina e a expressão de Snail e Twist. A associação de expressão de E-caderina e β -catenina com fatores prognósticos tem também demonstrado achados discrepantes, com Gama et al. (2008) demonstrando correlação de perda de expressão com menor sobrevida e menor intervalo livre de doença, e Brunetti et

al. (2005) não encontrando associação semelhante.

Para neoplasias mamárias em felinos, os achados vão em mesmo sentido, com expressão de E-caderina e β -catenina correlacionando-se negativamente com grau tumoral e presença de metástase, e havendo também uma correlação negativa entre a expressão de E-caderina e N-caderina, indicando também ganho de caderinas associadas ao fenótipo mesenquimal (PEÑAFIEL-VERDU et al., 2012; BUENDIA et al., 2014). No entanto, embora a expressão de vimentina em células luminais em 91% dos casos de carcinoma pudesse indicar uma transformação em fenótipo mesenquimal, aventa-se a possibilidade de se tratar de um componente luminal não terminalmente diferenciado, oriundo de uma célula precursora com potencial de bidiferenciação, já que a expressão de vimentina ocorre também em epitélio luminal de tecido glandular mamário normal adjacente (CALIARI et al., 2014).

Para outras neoplasias, há estudos demonstrando resultados variados, alguns deles corroborando a teoria da EMT, e outros menos consistentes, e alguns deles não estudando especificamente o tema da EMT, mas com alguns resultados que poderiam ser atribuídos a este mecanismo.

Para tumores colorretais em cães, foi observada progressiva perda de expressão de E-caderina e β -catenina na comparação entre cólon normal, displásico, com adenoma e com carcinoma (RESTUCCI et al., 2009). A expressão de vimentina foi demonstrada em uma pequena proporção de uma série de tumores hepáticos em cães, incluindo carcinomas hepatocelulares moderadamente e pouco diferenciados, e um hepatocolangiocarcinoma (MULAS et al., 1995). Para carcinomas renais em cães, foi encontrada uma elevada proporção de casos com expressão de vimentina (84,6% dos casos), com maiores níveis de expressão de vimentina aparentemente correlacionando-se com casos que demonstraram menores níveis de expressão das citoqueratinas AE1/AE3, Cam5.2 e WSS, além de 1 caso com morfologia sarcomatoide (COSTA et al., 2011). Em carcinomas pulmonares caninos, foi encontrada co-expressão de AE1/AE3 e vimentina em 38% dos casos. Escores maiores de vimentina foram encontrados em áreas com padrão tumoral mais anaplásico e valores menores para áreas papilares, mais bem diferenciadas (BURGESS; KERR, 2009). Para tumores prostáticos caninos, embora uma diferença estatística não tenha sido demonstrada, há uma aparente maior expressão de vimentina e maior perda de E-caderina e β -catenina para tumores mais agressivos em comparação com lesões hiperplásicas e tecido prostático normal, além de áreas de perda de expressão de citoqueratinas em tecido neoplásico (GRIECO et al., 2003; FONSECA-ALVES et al., 2015). Foi demonstrada também a presença de células neoplásicas intravasculares, totalmente dissociadas e individualizadas, com perda total da expressão de AE1/AE3 e E-caderina, e marcante expressão de

vimentina, porém sua origem prostática foi confirmada com marcação de PSA, indicando possivelmente um momento de total transformação mesenquimal de células neoplásicas epiteliais. Já nos sítios metastáticos, foi observada retomada da expressão de AE1/AE3 e E-caderina, embora em menores proporções que focos primários, sugerindo a ocorrência do mecanismo reverso de MET (FONSECA-ALVES et al., 2015).

A avaliação de N-caderina aparenta não ser um método consistente para investigação de mecanismo de EMT em tumores de origem neural, e não há diferenças nos níveis de expressão desta proteína entre os diferentes graus de meningiomas em cães. Porém, há uma aparente diminuição da expressão em graus mais agressivos de tumores de plexo coroide, controversamente ao que seria esperado para a EMT. Para estas neoplasias, a N-caderina é expressa em tecido normal não neoplásico, e a perda de expressão nestes tumores pode representar uma menor diferenciação celular, e não uma associação com a EMT (MANDARA et al., 2015; REGINATO et al., 2016). Em carcinomas tireoidianos caninos, embora tenha sido demonstrada uma maior expressão de E-caderina em carcinomas de origem medular em comparação com os de origem folicular, não foi encontrada correlação entre diferentes níveis de expressão de E-caderina com relação à invasão local, presença de metástase no momento do diagnóstico ou características prognósticas, como sobrevida global, intervalo livre de doença, tempo para metástase à distância e tempo para recorrência loco-regional (CAMPOS et al., 2014).

Para carcinomas de células escamosas em cães, há uma maior expressão de vimentina e uma menor expressão de marcadores de adesão celular (E-caderina, β -catenina e desmogleína) e pancitoqueratina em áreas invasivas da neoplasias, e raros casos também expressando N-caderina (BONGIOVANNI et al., 2013; BELLUCO et al., 2013; NAGAMINE et al., 2017). No entanto, em êmbolos intravasculares de células tumorais, foi observado padrão de expressão variado, com alguns casos demonstrando manutenção de marcadores de adesão celular, e algumas células demonstrando expressão de vimentina (BELLUCO et al., 2013; NAGAMINE et al., 2017).

2.3.3 Evidências de transição epitélio-mesenquimal em tumores de glândula hepatoide

Para tumores de glândula hepatoide, o mecanismo de transição epitélio-mesequimal não tem sido especificamente estudado, mas há algumas evidências que sugerem que este processo ocorra. Alguns estudos têm demonstrado expressão de

vimentina em células neoplásicas dos tumores hepatoides, tanto em tumores benignos quanto em malignos. Porém, tanto a intensidade de marcação quanto a proporção de células positivas é significativamente maior nos epitelomas e carcinomas em comparação com o tecido normal e adenomas (JASIK; KOZACZYNSKI; REICHERT, 2009; SARAIVA, 2011; PIEPER et al., 2015; ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN et al., 2016). Outros estudos avaliaram a expressão de claudinas-4, -5 e -7, proteínas de membrana envolvidas na estrutura de junções ocludentes de células epiteliais, e demonstraram marcação positiva em células diferenciadas, ausência de expressão em células de reserva, e foram observados casos de carcinoma com marcação citoplasmática de claudina-7 (JAKAB et al., 2009; JAKAB et al., 2010a; JAKAB et al., 2010b). Quanto à expressão de citoqueratinas, Saraiva (2011) descreve a expressão subtotal de pancitoqueratina e CK17 em casos de carcinoma, com poucos casos demonstrando ausência de expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas, embora estes achados não tenham sido comparados com adenomas e tecido glandular normal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer critérios diagnósticos e fatores prognósticos em tumores de glândula hepatoide em cães, baseados em parâmetros clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o grau de concordância diagnóstica entre múltiplos patologistas, de acordo com critérios histomorfológicos pré-estabelecidos;
- Analisar o impacto da aplicação de novos algoritmos diagnósticos na concordância entre patologistas;
- Determinar a participação do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal na progressão tumoral por meio de marcadores imuno-histoquímicos;
- Analisar a taxa de proliferação celular nos diferentes grupos diagnósticos;
- Analisar o impacto de diversos critérios clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos na sobrevida dos pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LEVANTAMENTO DE CASOS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os casos foram selecionados a partir de dados obtidos por um laboratório privado de anatomia patológica veterinária, com a anuência formal do Médico Veterinário patologista responsável. A pesquisa inicial foi realizada em arquivo digital de relatórios anatomopatológicos de cães (*Canis familiaris*), e os termos de interesse foram pesquisados em conteúdo indexado dos relatórios, com o auxílio de operadores booleanos, da seguinte forma: [(“hiperplasia” ou “adenoma” ou “epitelioma” ou “adenocarcinoma” ou “carcinoma”) e (“perianal” ou “perineal” ou “hepatoide” ou “circumanal”)]. Os relatórios obtidos foram analisados e foram incluídos apenas os casos com pelo menos um dos diagnósticos descritos a seguir: “hiperplasia de glândula hepatoide”, “adenoma de glândula hepatoide”, “epitelioma de glândula hepatoide” e “carcinoma de glândula hepatoide” (considerando-se também as sinônimas adenocarcinoma, perianal, perineal, circumanal). Para composição do grupo destinado ao estudo de reprodutibilidade, os casos foram incluídos, sequencialmente, a partir do dia 1º de janeiro de 2016 até 12 de abril de 2016, obtendo um total de 57 lesões nodulares, provenientes de 45 animais. Nesta seleção, foram incluídos apenas os casos em que o veterinário solicitante, em requisição de exame, tivesse especificado se tratar de uma amostra total, ou seja, amostra oriunda de ressecção tumoral. Posteriormente, foram adicionados casos morfolologicamente mais agressivos, para avaliação de parâmetros clínico-patológicos e correlações prognósticas, em conjunto com os casos selecionados inicialmente. Assim, foi realizada uma nova pesquisa em base de dados dos relatórios anatomopatológicos, compreendendo o período de janeiro de 2000 a setembro de 2017. Para isso, os termos de interesse foram pesquisados com o auxílio de operadores booleanos, da seguinte forma: [(“perianal” ou “perineal” ou “hepatoide” ou “circumanal”) e (“linfonodo” ou “metástase” ou “metastático” ou “metastática” ou “embolização” ou “invasão linfática” ou “invasão vascular”)]. Todos os relatórios recuperados foram lidos e foram selecionados aqueles que relatavam carcinoma de glândula hepatoide com invasão vascular e/ou com metástase em linfonodo. Nesta nova pesquisa, foram selecionados 21 tumores provenientes de 17 animais.

As lâminas histopatológicas, quando disponíveis, foram recuperadas do arquivo e reavaliadas por um patologista (P1) para caracterização da qualidade e adequabilidade do material. Novas lâminas foram confeccionadas a partir de blocos de parafina para

casos em que não havia lâminas disponíveis ou se as mesmas apresentavam artefatos (como diminuição da intensidade dos corantes, artefatos de microtomia, artefatos de processamento, danos físicos). Casos considerados inadequados para análise, seja por conta de excesso de artefatos ou por amostra em bloco de parafina insuficiente para novas análises, foram excluídos. Para os casos mais agressivos, foram incluídos apenas os casos nos quais foi possível, em uma reavaliação, confirmar a origem do tumor em glândula hepatoide, assim como a presença de invasão vascular ou metástase em novas lâminas histopatológicas confeccionadas.

Este trabalho foi protocolado sob o nº CEUA 4945080716 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.2 ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE

As amostras do levantamento sequencial foram submetidas à análise histopatológica por 5 patologistas veterinários distintos (patologistas P1, P2, P3, P4 e P7). Previamente à análise, foram fornecidas aos patologistas participantes as referências de classificação morfológica oriundas da literatura, amplamente utilizadas em programas internacionais de treinamento em patologia veterinária (MUNSON et al., 2010), a saber: *Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals* (GOLDSCHMIDT, 1998), *Skin diseases of the dog and cat*, 2ª edição (GROSS et al., 2005) e *Tumors in Domestic Animals*, 4ª edição (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Encontram-se em apêndices A e B as fichas encaminhadas aos patologistas para a avaliação dos casos.

Inicialmente, cada caso foi classificado quanto ao diagnóstico morfológico, em 4 categorias distintas: hiperplasia, adenoma, epitelioma ou carcinoma. Ademais, os casos foram classificados de acordo com uma série de características morfológicas, a saber: grau de infiltração, atipia celular e perda de polaridade celular (ambos de acordo com grau e distribuição), proporção de células de reserva, proporção de tecido tumoral demonstrando necrose, diferenciação sebácea, diferenciação escamosa, contagem de mitoses em 10 campos de maior aumento, presença/ausência de mitoses atípicas, presença/ausência de mitoses em células diferenciadas ou parcialmente diferenciadas e presença/ausência de invasão vascular pelas células neoplásicas. Um maior detalhamento quanto aos critérios

morfológicos e suas categorias encontra-se descrito no quadro 4.

A perda polaridade celular foi definida como o grau de desorganização do padrão de maturação de células de reserva em células diferenciadas, com polaridade preservada caracterizada por células de reserva dispostas na periferia dos lóbulos, com células maduras ao centro, de maneira semelhante ao observado em glândulas hepatoides normais, e perda de polaridade caracterizada por graus variáveis de desvios desta disposição. Para a contagem de mitoses, os patologistas foram instruídos a realizarem a contagem em 10 campos contíguos e não sobrepostos, considerando as áreas com maior atividade mitótica (*hot-spots*) e evitando áreas próximas de ulceração. Foi sugerida a realização de mais de uma contagem de mitoses por caso, com o intuito de melhorar a detecção dos *hot-spots*, sempre considerando a contagem de maior número. Para a conversão e comparação dos valores de contagem de mitoses, foi registrado também o tamanho do campo da ocular (FN) do microscópio utilizado por cada patologista. Os diagnósticos foram realizados às cegas, sem conhecimento de diagnóstico prévio por parte dos patologistas. Não foi permitida a realização de segunda opinião ou diagnóstico por consenso. Para a definição da experiência de cada patologista, foi avaliado o tempo de experiência, em anos, do médico veterinário com patologia veterinária, excluindo-se o período de residência em anatomia patológica. Em caso de dados faltantes após o retorno dos questionários, e quando possível, os patologistas foram contactados para reavaliação.

Após a primeira análise, dois dos patologistas (P1 e P2) reavaliaram os mesmos casos quanto aos diagnósticos (cegos quanto à identificação original do caso) para avaliação de variação intraobservador (as reavaliações foram identificadas como P5 e P6), em um intervalo de 6 e 7 meses após a primeira análise, respectivamente.

Quadro 4: Detalhamento de critérios morfológicos de análise histopatológica - São Paulo - 2018

Grau de infiltração 1: Não se aplica (não infiltrativo) 2: Raros focos de infiltração 3: Parcialmente bem demarcado, parcialmente infiltrativo 4: Predominantemente infiltrativo	Células de reserva 1: 0-25% 2: 25-50% 3: 51-75% 4: 76-100% 5: 76-100%		Necrose 1: 0 2: 1-25% 3: 25-50% 4: 51-75%
Diferenciação sebácea 1: Ausente 2: Raros focos 3: Moderada a marcante	Contagem de mitoses		
	Atipia mitótica 0: Não 1: Sim		
Atipia celular 1: Sem atipia/mínima atipia celular difusa 2: Sem atipia/mínima atipia celular com raros focos de moderada atipia 3: Parcialmente com atipia mínima e parcialmente com moderada atipia 4: Moderada atipia com raros focos de mínima atipia 5: Moderada atipia celular difusa 6: Sem atipia/mínima atipia celular com raros focos de intensa atipia 7: Moderada atipia celular com raros focos de intensa atipia 8: Parcialmente com atipia mínima e parcialmente com intensa atipia 9: Parcialmente com atipia moderada e parcialmente com intensa atipia 10: Intensa atipia celular com raros focos de mínima atipia 11: Intensa atipia celular com raros focos de moderada atipia 12: Intensa atipia celular difusa	Invasão vascular 0: Não 1: Sim		
	Perda de polaridade celular 1: Polaridade celular preservada, difusamente 2: Polaridade preservada com raros focos de moderada perda de polaridade 3: Parcialmente com polaridade preservada e parcialmente com moderada perda de polaridade 4: Moderada perda de polaridade e raros focos de polaridade preservada 5: Moderada perda de polaridade difusa 6: Polaridade preservada com raros focos de intensa perda de polaridade 7: Moderada perda de polaridade raros focos de intensa perda de polaridade 8: Parcialmente com polaridade preservada e parcialmente com intensa perda de polaridade 9: Parcialmente com perda de polaridade moderada e parcialmente com intensa perda de polaridade 10: Intensa perda de polaridade com raros focos de polaridade preservada 11: Intensa perda de polaridade raros focos de moderada perda de polaridade 12: Intensa perda de polaridade difusamente		

Fonte: WASQUES, 2018

4.3 CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS ADICIONAIS

Além dos critérios morfológicos avaliados por múltiplos patologistas, um dos patologistas (P1) avaliou, tanto em lesões neoplásicas quanto em glândulas adjacentes às neoplasias, a presença ou ausência de células multinucleadas/sinciciais (variável binária). Foram considerados positivos casos em que foi observado ao menos uma célula contendo mais de dois núcleos. Adicionalmente, as lesões tumorais foram categorizadas quanto à presença ou ausência de células contendo inclusões claras intranucleares (variável binária), caracterizadas por clareamento intranuclear, não revestido por carioteca, e rechaçando cromatina para periferia nuclear. Pseudoinclusões nucleares (inclusões revestidas por carioteca) não foram consideradas nesta análise.

A proporção de células neoplásicas assumindo morfologia fusiforme foi quantificada para cada caso. Para tal, foi utilizado um escore de 0 a 10, de acordo com a percentagem de área tumoral ocupada por células neoplásicas fusiformes (estimativa visual - células fusiformes de estroma não foram consideradas). O escore foi considerado proporcional à percentagem estimada (ex.: escore 0 corresponde a 0% de células fusiformes, escore 1 corresponde de 1 a 10%, escore 2 de 11 a 20%, e etc.)

4.4 REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

4.4.1 Procedimento técnico

Foi selecionado um bloco de parafina representativo para cada lesão nodular incluída no estudo, o qual foi submetido ao procedimento imuno-histoquímico para análise da proliferação celular (Ki-67) e transição epitélio-mesenquimal (pantoqueratina, vimentina e E-caderina). A partir de blocos de parafina foram realizados novos cortes histológicos de 5 μ m, em lâminas silanizadas, que foram subsequentemente desparafinizados, hidratados e submetidos ao desmascaramento antigênico em panela de pressão elétrica durante 16 minutos, utilizando solução tampão citrato (pH 9,0)(Spring - Cód PMB4-250). Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ 6% em metanol, por 20 minutos, protegidas da luz. Após lavagens em água corrente, água destilada e em tampão de lavagem TBS, as lâminas foram

Quadro 5: Detalhamento de metodologia imuno-histoquímica - São Paulo - 2018

Antígeno alvo	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	
				Tampão	Tempo(min)
Pancitoqueratina	AE1AE3	Dako	1:1000	Citrato (pH 9)	16
Vimentina	V9	Dako	1:1000	Citrato (pH 9)	16
Ki-67	MIB-1	Dako	1:1000	Citrato (pH 9)	16
E-caderina	4A2C7	Invitrogen	1:100	Citrato (pH 9)	16

Fonte: WASQUES, 2018

incubadas com os anticorpos primários específicos (Quadro 5), diluídos em diluente de anticorpo (ScyTek - Cód ATG125), pelo período de 60 minutos e em estufa mantida a 37°C. Após incubação, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem em pisseta e iniciado o sistema de visualização por polímero. Primeiramente foi aplicado o polímero Reveal HRP Complement (Spring – Cód DCMT-125), por 10 minutos em temperatura ambiente. Após, o reagente HRP Reveal Conjugate (Spring – Cód DHRR-125) foi aplicado por 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram reveladas pelo cromógeno tetracloreto de 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Spring – substrato Cód DABS-125, cromógeno Cód DABC-004) por 5 minutos e em temperatura ambiente. Após lavagens em água corrente e destilada, as lâminas foram contra coradas em hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e destilada e realizados 3 banhos rápidos em água amoniacal (0,5%). Por fim, as lâminas foram lavadas e submetidas à bateria de desidratação e diafanização. Para montagem, foram utilizadas lamínulas coladas por Permout (ThermoFischer). Lâminas adicionais foram confeccionadas e submetidas a um anticorpo irrelevante de mesmo isotipo e em mesma diluição que os demais (HepPar-1) como controle negativo da reação.

4.4.2 Controle de qualidade

As lâminas de imuno-histoquímica foram avaliadas quanto à qualidade da reação, para determinar sua inclusão definitiva no estudo. Os critérios de inclusão avaliados nesta etapa foram: (1) marcação do controle interno (adequada, falso negativo ou falso positivo); (2) presença de marcação inespecífica (discreta, moderada ou marcante); (3) homogeneidade de marcação (adequada, discreta perda artefactual de marcação, moderada perda artefactual de marcação ou marcante perda artefactual de marcação).

A avaliação da positividade foi realizada pelos controles teciduais internos para

cada anticorpo, atestando assim, a funcionalidade das reações. Os controles internos utilizados foram os seguintes: (1) vimentina, positividade esperada no citoplasma de células mesenquimais da derme e vasos, porém negativa em epiderme e anexos cutâneos; (2) pancitoqueratina, positividade esperada no citoplasma de células epiteliais da epiderme e anexos cutâneos, porém negativa em células mesenquimais da derme e vasos; e (3) E-caderina, positividade esperada em membrana de células epiteliais da epiderme e anexos cutâneos, porém negativa em células mesenquimais da derme e vasos. Casos em que não houve marcação adequada do controle tecidual interno (falso positivo ou falso negativo) tiveram suas reações repetidas, sendo excluídos na persistência do problema.

Por se tratar de um estudo retrospectivo com material de arquivo, uma discreta quantidade de marcação inespecífica (fundo ou *background*) foi considerada aceitável, desde que não interferisse na análise. Casos que apresentaram intensa marcação inespecífica foram submetidos à repetição da reação imuno-histoquímica, sendo excluídos na persistência do problema. Da mesma forma, uma discreta perda de marcação artefactual, atribuída a defeitos de fixação de material e caracterizada pela perda gradual de marcação, incluindo nos controles teciduais internos, foi considerada aceitável. Ressalta-se que as áreas com perda de marcação foram excluídas da análise semi-quantitativa. Casos em que esta perda de marcação tenha sido observada em intensidade suficiente para prejuízo de análise tiveram suas reações repetidas, sendo excluídos na persistência do problema.

4.4.3 Análise morfológica e semi-quantitativa da imunoexpressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal

As imunoexpressões de vimentina, pancitoqueratina e E-caderina foram avaliadas por um mesmo patologista (P1), sendo utilizado um escore semi-quantitativo, que considera tanto a intensidade de marcação quanto a proporção de células positivas, de acordo com quadro 6. A imunoexpressão de cada marcador foi avaliada separadamente para as células de reserva e células diferenciadas. Da mesma forma, foram avaliadas separadamente o tecido tumoral e o tecido glandular adjacente não tumoral, quando presente na amostra. A avaliação foi realizada às cegas pelo patologista, uma vez que o mesmo não tinha conhecimento dos diagnósticos definidos para cada caso.

Adicionalmente, foi avaliado se houve coincidência da imunoexpressão de vimentina ou perda da imunoexpressão de E-caderina e/ou pancitoqueratina em células neoplásicas com morfologia fusiforme ou em regiões de bordo infiltrativo de neoplasias

Quadro 6: Escore semi-quantitativo aplicado em análise imuno-histoquímica de vimentina, pancitoqueratina e E-caderina

Escore de intensidade de marcação (EI)	
0	marcação ausente
1	marcação discreta
2	marcação moderada
3	marcação intensa
Escore de distribuição (ED)	
0	marcação ausente
1	1-10% de células marcadas
2	11-25% de células marcadas
3	26-50% de células marcadas
4	51-75% de células marcadas
5	76-90% de células marcadas
6	91-99% de células marcadas
7	100% de células marcadas
Escore final = EI x ED (0-21)	

Fonte: WASQUES, 2018

infiltrativas, utilizando-se uma variável binária (presença ou ausência de expressão). Ainda, foi avaliado o mesmo parâmetro de imunoexpressão na comparação de diferentes secções dos casos, utilizando-se também uma variável binária (presença ou ausência de coincidência). Quanto ao padrão de marcação, foi avaliado quais padrões eram predominantes para os marcadores vimentina e pancitoqueratina, tanto em células diferenciadas quanto em células de reserva, e tanto em tecido tumoral quanto em tecido glandular adjacente. Os padrões morfológicos de marcação considerados foram: (1) padrão citoplasmático (granular ou difuso); (2) padrão perinuclear; e (3) padrão membranoso.

Além da imunoexpressão membranosa de E-caderina, em alguns casos também foi observada marcação citoplasmática, em intensidades e distribuições variáveis. Foi realizada uma quantificação da quantidade de células neoplásicas contendo marcação citoplasmática de E-caderina. Esta análise foi realizada tanto em tecido tumoral quanto em tecido glandular adjacente. Para esta análise, foi considerada a quantidade de células positivas em 10 campos de 40× (Ocular 10×/FN20), com resultado convertido para número de células por 2,37 mm². Para manter consistência na análise, foram consideradas para contagem apenas as células com marcação citoplasmática difusa, com o núcleo preservado na secção e com ausência de destaque de membrana pela marcação. Células com marcação citoplasmática parcial ou submembranosa apenas, ou com delineamento mais intenso de membrana em relação à marcação citoplasmática não foram consideradas para esta contagem.

Figura 2: Exemplificação do método de contagem de ki-67: com auxílio do software Qupath, as células positivas são marcadas em vermelho e as células negativas marcadas em azul. As células estromais são marcadas de verde, e são excluídas do cálculo final

4.4.4 Avaliação da taxa de proliferação celular

A avaliação de taxa de proliferação foi realizada por meio de imuno-histoquímica e contagem das células neoplásicas positivas para o antígeno de proliferação celular, Ki-67. Para a contagem das taxas de proliferação, foram fotografados 3 campos microscópicos para cada neoplasia em objetiva de 40x (cada imagem medindo 435x271,9 μ m, com resolução de 0,21 μ m/pixel), procurando-se incluir aqueles com maior quantidade de células positivas para Ki-67 (*hot spots*). Com o auxílio do software Qupath (v0.1.2, open source)(Figura 2), foi realizada contagem manual de células neoplásicas positivas e células negativas. Foram consideradas como células positivas qualquer célula tumoral demonstrando marcação nuclear, independente da intensidade. As células estromais foram também marcadas para evitar classificação errônea, porém foram excluídas do cálculo final para obtenção da taxa de proliferação.

A taxa de proliferação foi obtida pela fórmula:

$$\frac{N_{pos}}{N_{pos} + N_{neg}}$$

e expressa em porcentagem, onde N_{pos} corresponde à quantidade de células positivas, e N_{neg} corresponde à quantidade de células negativas.

4.5 COLETA DE DADOS DE SEGUIMENTO

Durante um período de 4 meses, os clínicos veterinários responsáveis pelos casos incluídos no estudo foram contatados por e-mail ou telefone, quando disponíveis, para obtenção das informações clínicas acerca do seguimento do paciente. Questionários padronizados foram encaminhados (Apêndice C) e as seguintes informações foram solicitadas: (1) Confirmação de informações de dados clínicos presentes no relatório histopatológico, com correções quando pertinentes; (2) data de atendimento clínico do paciente, referente à lesão neoplásica em estudo; (3) tamanho do tumor; (4) *status* sexual do paciente no momento do diagnóstico (castrado ou inteiro) e a idade de castração; (5) em caso de diagnóstico citológico prévio, se houve concordância de diagnóstico citológico com o histopatológico, e de que maneira o diagnóstico citológico influenciou na conduta terapêutica; (6) em caso de diagnóstico prévio por biópsia incisional, se houve concordância de diagnóstico com a biópsia excisional (ressecção), e de que maneira o diagnóstico influenciou na conduta terapêutica; (7) terapia empregada (ressecção cirúrgica, quimioterapia, castração, observação/monitoramento periódico); (8) em caso de ampliação de margens cirúrgicas, se foi obtida margens livres em ampliação; (9) se restaram outras lesões nodulares além da incluída no estudo, e se estas foram ressecadas; (10) de que maneira foi realizado acompanhamento clínico/monitoramento periódico do paciente (não realizado, contato telefônico com o proprietário, atendimento clínico, exames complementares), e com qual periodicidade; (11) última data de avaliação do paciente; (12) se houve recidiva(s) de lesão nodular e, caso afirmativo, em que data(s), e qual terapia empregada para as recidivas (ressecção cirúrgica, quimioterapia, castração, observação/monitoramento periódico); (13) se houve metástase(s) da lesão nodular e, caso afirmativo, em que data(s), quais órgãos acometidos, quais métodos de detecção, e qual terapia empregada; (14) se o animal veio a óbito e, caso afirmativo, em que data, qual a provável causa do óbito, e se foi eutanasiado; (15) se a lesão nodular em estudo representa uma apresentação primária, ou se trata-se de uma recorrência de tumor hepatoide; (16) para pacientes machos, se há diagnóstico prévio de neoplasia testicular.

A data inicial considerada para o seguimento foi a data de liberação do relatório histopatológico, e a data considerada para as recorrências/metástases foram as fornecidas pelos clínicos, referentes às datas de atendimento ou testes complementares adicionais, quando aplicáveis. Em caso de ausência de precisão de dia do mês em determinada data fornecida pelo clínico, foi considerado o dia “15” para efeitos de cálculo. Casos com perda de seguimento ou com desfechos diferentes dos avaliados para cada análise de

sobrevida foram censurados. Os diferentes desfechos avaliados foram: (1) intervalo livre de recorrência local; (2) intervalo livre de doença; (3) sobrevida global; (4) sobrevida específica da doença. Os óbitos foram atribuídos à neoplasia hepatoide em caso de morte natural ou eutanásia decorrentes de progressão da doença/metástase, e apenas em casos em que a metástase não pudesse ser atribuída a outro processo neoplásico concomitante. As diversas variáveis referentes aos critérios morfológicos e diagnósticos histopatológicos (oriundas do patologista P1), bem como os resultados de análise imuno-histoquímica, dados do paciente (idade, sexo, status sexual no momento e após o diagnóstico), margens cirúrgicas, presença de células multinucleadas, presença de inclusões nucleares, escore de morfologia fusiforme, tamanho tumoral (considerando a maior dimensão descrita em relatório macroscópico anatomopatológico), número de nódulos e histórico de tratamento quimioterápico foram avaliados. Para a avaliação de margens, foi considerada uma classificação em três categorias, de acordo com Scarpa et al. (2012), considerando margens livres (distância maior que 2 mm de margem), estreitas (distância menor que 1 mm de margem), e margem comprometida (tecido tumoral estendendo-se até os bordos da secção). Casos em que foi relatada ampliação de margens posteriormente à ressecção, e que foi relatada estar livre de células neoplásicas, foram considerados como livres de células neoplásicas. Para casos em que um paciente apresentou múltiplas lesões nodulares, foi realizada uma composição considerando os valores mais agressivos para cada variável (ex. maior índice mitótico, maior taxa de proliferação celular, maior tamanho tumoral, menor escore de E-caderina, etc.), e o diagnóstico mais agressivo foi considerado para o caso.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diversas variáveis estudadas foram avaliadas quanto ao desvio de normalidade através de análise de histogramas e por meio de teste de Shapiro-Wilk para decisão dos testes a serem implementados.

As análises de concordância entre os patologistas foram realizadas pelo método de κ de Cohen para variáveis categóricas binárias, e por coeficiente de correlação intraclassa (ICC) para variáveis ordinais ou numéricas, na forma ICC(2,1) de acordo com Shrout e Fleiss (1979), para cada par de patologista. Os resultados dos coeficientes de concordância para cada patologista foram expressos em média (mediana [intervalo interquartil]), e foi realizado cálculo do valor médio e mediano para obtenção da

concordância do grupo. Para a confecção do algoritmo diagnóstico, as classificações dos diversos critérios morfológicos foram combinados, e diversas árvores de regressão por partição recursiva foram confeccionadas, considerando diversos padrões ouro como desfechos (e.g.: concordância de 100% carcinoma, concordância de 80% em carcinoma, concordância de 50% em carcinoma, considerando apenas os 4 patologistas mais experientes, etc.), e considerando tanto uma classificação binária (benigno x maligno), quanto uma classificação em 3 categorias [(benigno, maligno e limítrofe (*borderline*)]. Foram selecionadas as árvores de decisão de menor complexidade e que tivessem demonstrado uma melhora de reprodutibilidade diagnóstica ao ser aplicada para cada patologista. Os valores de κ e ICC foram interpretados de acordo com as diretrizes de Cicchetti e Sparrow (1981 apud CICCHETTI, 1994)(Quadro 3).

Para a comparação do impacto dos algoritmos e da conversão de contagem de mitoses na concordância interobservador, foi realizado teste t pareado, com cálculo de d de Cohen e diferença de médias.

Para as análises subsequentes, foram considerados 4 grupos para comparação: glândulas hepatoides normais (a partir de análise de glândulas hepatoides adjacentes às lesões nodulares, quando presentes), tumores benignos (contemplando hiperplasias e adenomas), tumores malignos (contemplando epitelomas e carcinomas, excluindo-se casos com invasão vascular ou metástase no momento diagnóstico), e tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos (quando apresentando evidências histológicas de invasão vascular e/ou metástase no momento do diagnóstico). Estes diagnósticos de referência foram os mesmos obtidos em análise de patologista P1 em associação com os casos agressivos levantados posteriormente.

Para a comparação dos escores imuno-histoquímicos entre os grupos, foi utilizado teste de Kruskal Wallis e, em caso de significância, teste exato de Wilcoxon-Mann-Whitney para cada par de comparação, com correção de Bonferroni, utilizando-se como método de desempate os postos intermediários (*mid-ranks*), e utilizando-se de teste unicaudal, tendo como hipótese uma maior expressão de vimentina e Ki-67 e menor expressão de E-caderina e pancitoqueratina em tumores malignos em comparação com tumores benignos/glândulas normais. O tamanho de efeito (r) foi também calculado para cada comparação.

As correlações entre os diversos parâmetros avaliados (escores imuno-histoquímicos, morfologia fusiforme, contagem de mitoses e taxa de proliferação celular) foram realizadas por teste de correlação de Spearman.

Para comparação da proporção de casos com presença de células multinucleadas ou células com inclusão nuclear entre os grupos, foram utilizados testes de χ^2 e teste exato

de Fischer, conforme apropriado.

Para a classificação diagnóstica de acordo com taxa de proliferação Ki67, foram realizadas curvas ROC, de acordo com Robin et al. (2011). Foi realizada uma curva ROC para cada um dos 5 desfechos diagnósticos (considerando as análises dos 5 patologistas), e todos os pares de curvas geradas foram comparadas por meio de teste de DeLong. Para definição do ponto de corte a ser utilizado para o diagnóstico, foi utilizado o ponto com o valor máximo do índice de Youden (J), de acordo com a seguinte fórmula:

$$J = \text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1$$

As áreas sob curva ROC foram computadas para cada patologista, bem como os valores de sensibilidade e especificidades para o diagnóstico de neoplasia maligna.

Para a análise de sobrevida, foi realizada análise univariada por meio regressão de risco proporcional de Cox com penalização de Firth, e para variáveis preditivas foram confeccionadas curvas de Kaplan Meier. Para variáveis contínuas ou ordinais, foram realizadas curvas ROC para variáveis dependentes de tempo, de acordo com Li, Hu e Greene (2015), e considerando como horizonte temporal o maior período de seguimento disponível para cada desfecho. Para definição do ponto de corte a ser utilizado em curvas de sobrevida, foi utilizado o ponto com o valor máximo do índice de Youden, de maneira semelhante ao previamente descrito. As áreas sob curva ROC foram também computadas para cada variável preditiva, bem como as estimativas de sobrevida em 1 ano, e sobrevida mediana, quando disponíveis.

Foi considerado o nível de significância (α) de 5%.

As análises foram realizadas em linguagem R (v3.4.3, open source) e auxiliadas pelo Apache OpenOffice Calc (v4.1.3, open source) para elaboração dos dados. Os pacotes da linguagem R utilizados foram irr, coin, tdROC, pROC, coxphf, rpart, survival e survminer.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA E ANATOMOPATOLÓGICA

Foi avaliado um total de 78 lesões tumorais, oriundas de 62 pacientes. Com relação à raça, havia 19 (30,6%) cães sem raça definida, 9 (14,5%) Poodles, 7 (11,2%) Labradores, 6 (9,6%) Cocker Spaniels, 3 (4,8%) Lhasa Apsos, 3 (4,8%) Shih Tzus, 2 (3,2%) terriers brasileiros, 2 (3,2%) Beagles, e 1 (1,6%) de cada uma das raças Akita, Bichon Frisé, Buldogue, Golden Retriever, Pastor alemão, Pastor belga, Schnauzer, Staffordshire Bull Terrier, Teckel, West Highland White Terrier e Yorkshire. A idade foi informada em 58 pacientes, com média de $11,17 \pm 3$ (2 - 18) anos e mediana de 12 anos. O sexo foi informado em 59 pacientes, com 56 machos (94,9%) e 3 fêmeas (5,1%). O *status* sexual foi informado para 33 pacientes, sendo 22 (66,6%) cães inteiros no momento do diagnóstico, e 11 (33,4%) castrados. Dentre os animais castrados, 9 (81,8%) eram machos e 2 (18,2%) eram fêmeas e, dentre estes 9 machos, a idade de castração foi informada para 8 pacientes, com média de $8,69 \pm 2,49$ (5 - 12) anos e mediana de 8 anos.

Considerando as 78 lesões tumorais incluídas neste estudo e analisadas por um dos patologistas (P1), foram diagnosticadas 3 (4%) hiperplasias nodulares, 25 (32%) adenomas, 2 (2,5%) epitelomas e 48 (61,5%) carcinomas. Dentre os carcinomas, 14 (29,1%) apresentaram evidências histológicas de invasão vascular (denominados “carcinomas vasculoinvasivos”) e 8 (18,8%) eram carcinomas metastáticos (6 sítios metastáticos em linfonodo e 2 sítios primários). Ressalta-se que, no levantamento sequencial, foram diagnosticados 3 (5,3%) hiperplasias nodulares, 25 (43,9%) adenomas, 2 (3,5%) epitelomas e 27 (47,3%) carcinomas. Dentre os carcinomas, apenas 1 (3,7%) apresentou invasão vascular e nenhum apresentou metástase no momento do diagnóstico.

A grande maioria das lesões (56/78, 71,8%) estava localizada em região anal/perianal, seguida da cauda (8, 10,3%). Outros locais menos frequentemente acometidos foram a região inguinal direita, região peniana e linfonodo inguinal (2 lesões cada, 2,6%), linfonodo (não especificado qual), região de coluna, região lombar, face e linfonodo submandibular direito (1 cada, 1,3%). O local de origem não foi especificado em 2 lesões.

Em 17/62 (27,4%) pacientes, as lesões apresentaram-se como múltiplos nódulos, sendo 14 (18%) pacientes com 2 lesões nodulares, e 1 (1,2%) paciente cada com 3 e 4

lesões nodulares. Para 1 dos casos foi relatada a presença de múltiplos nódulos perianais, mas não foi especificada a quantidade e tampouco foi realizada a avaliação histopatológica de todos os nódulos.

Em 21/62 (33,8%) pacientes, havia dados concernentes à presença ou ausência de lesões neoplásicas testiculares, seja no momento do diagnóstico da neoplasia hepatoide, seja no momento da castração, a depender do caso. Destes, havia diagnóstico de tumor de células intersticiais em 4/21 (19%) casos, seminoma em 3/21 (14,3%) casos e tumor de células de Sertoli em 2/21 (9,5%) casos. Em 3/8 destes casos, havia apresentação de múltiplas lesões testiculares nodulares de origem distinta: 1 caso com tumor de células intersticiais e seminoma, 1 caso com seminoma e tumor de células de Sertoli e 1 caso com tumor de células intersticiais, seminoma e tumor de células de Sertoli. Em 2 casos adicionais, havia suspeita de processo neoplásico pelo exame ultrassonográfico, mas não foi informada realização de exame histopatológico. Para o restante dos 14 casos, não foi relatada a presença de indícios de lesões tumorais testiculares, porém o exame histopatológico não foi realizado em todos os casos.

De modo geral, as hiperplasias foram caracterizadas por lesões nodulares ou em placa, demarcadas, com arquitetura glandular preservada, com células de reserva situadas periféricamente aos lóbulos, não sendo observadas atipias celulares ou arquiteturais. Os adenomas se caracterizaram por nódulos bem demarcados, não infiltrativos, com manutenção da polaridade celular, com células de reserva situadas periféricamente em lóbulos e trabéculas tumorais, e células diferenciadas mais ao centro, com atipia celular geralmente discreta ou moderada (figura 3A). De modo geral, o índice mitótico para as lesões benignas foi baixo ou ausente, com figuras mitóticas observadas predominantemente em células de reserva. Embora tenham sido caracterizadas pela ausência de comportamento infiltrativo, este critério demonstrou certa subjetividade em avaliação de algumas lesões, especialmente em casos com inflamação estromal importante, havendo ocasionalmente dificuldade de distinção entre invasão tumoral real ou reação fibroplásica associada ao infiltrado inflamatório ou, ainda, necrose tecidual (pseudoinvasão). Os carcinomas se caracterizaram por maior perda de polaridade, maior atipia celular e maior atividade mitótica, e frequentemente com comportamento infiltrativo (embora não tenham sido caracterizados como invasivos em todos os casos)(figura 3B). Os epiteliomas, por sua vez, se caracterizaram pela elevada quantidade de células de reserva, e distinguiram-se dos carcinomas pela menor atipia celular.

Nos tumores vasculoinvasivos, foram observados êmbolos neoplásicos de tamanhos variados em canais linfáticos, mais frequentemente acompanhando preservação de estroma fibrovascular discreto e, em alguns deles, demonstrando revestimento externo

por camada delgada de células endoteliais, sugerindo um não extravasamento para além da íntima vascular (figura 3C). Todas as lesões metastáticas incluídas no estudo foram observadas em linfonodo (figura 3D), sendo que alguns dos casos demonstraram aspecto bem diferenciado em sítio metastático, incluindo casos com baixa atividade mitótica (menos de 10 mitoses por 10 campos de maior aumento).

Células hepatoides multinucleadas foram observadas com frequência tanto em tecido tumoral quanto em tecido glandular adjacente (figura 3E). Estas células estavam presentes em 40/64 (62,5%) casos em glândulas normais, 14/28 (50%) casos em tumores benignos, 17/28 (60,7%) casos em tumores malignos, e em 17/22 (81%) casos em tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos. Não houve diferença estatística entre os grupos (χ^2 , $p=0,1755$).

Também foram observadas, raramente, inclusões claras intranucleares em células neoplásicas (figura 3F), presentes em 2/25 (7,1%) adenomas, 1/26 (3,6%) carcinoma, e 3/22 (13,6%) carcinomas vasculoinvasivos/metastáticos. Não houve diferença estatística entre os grupos (teste exato de Fischer, $p=0,4944$).

A tabela 1 detalha os dados clínicos e localizações das lesões estratificados por classificação diagnóstica nos grupos pré-determinados.

Figura 3: Características morfológicas dos tumores de glândula hepatoide

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Adenoma, HE. Polaridade preservada da relação entre células de reserva e células diferenciadas, sem atipias em células neoplásicas. (B) Carcinoma, HE. Perda marcante de polaridade entre relação de células diferenciadas e células de reserva, e áreas de diferenciação sebácea (seta). (C) Carcinoma, HE. Embolização de células neoplásicas em vaso linfático (*). (D) Metástase, HE. Infiltração de células neoplásicas (t) em linfonodo (ln). (E) Carcinoma, HE. Células hepatoides diferenciadas multinucleadas (setas). (F) Carcinoma. Células tumorais demonstrando inclusões claras intranucleares (setas).

Tabela 1: Detalhamento de dados clínicos de pacientes incluídos em estudo - São Paulo - 2018

	Tumores benignos	Tumores malignos	Tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos
n	28 tumores (18 animais)	28 tumores (26 animais)	22 tumores (18 animais)
Raça (n)	SRD (7), Lhasa Apso (3), Labrador (2), Cocker, Pastor Belga, Fox Terrier, Bichon Frisé, Yorkshire, Golden retriever (1 cada)	SRD (7), Cocker, Poodle (5 cada), Beagle, Shih Tzu (2 cada), Schnauzer, Labrador, Buldogue, Teckel, West (1 cada)	SRD (5), Labrador, Poodle (4 cada), Shih Tzu, Staffordshire, Pastor alemão, Akita, Fox terrier (1 cada)
Localização (n)	Anal/perianal (24) Cauda (3) Anal ou cauda (1)	Anal/perianal (21) Cauda (3), Região peniana, região lombar, anal ou cauda (1 cada), não informado (1)	Anal/perianal (10), região inguinal direita (2), linfonodo inguinal (2), face, linfonodo submandibular direito, linfonodo (não especificado), cauda, região de coluna, linfonodo inguinal esquerdo, região peniana (1 cada), não informado (1)
Idade (anos)	10,62 $\pm$ 2,99	12,48 $\pm$ 2,4	9,76 $\pm$ 3,15
Relação macho:fêmea	7,5:1	24:1	17:0
Tamanho (cm)	1,82 $\pm$ 0,94	1,9 $\pm$ 0,64	3,48 $\pm$ 1,43
Múltiplos nódulos	2 (11,1%)	8 (30,7%)	7 (38,8%)

Fonte: WASQUES, 2018

Para a contabilização da quantidade de animais, raça, idade e sexo, cada animal foi alocado no grupo diagnóstico mais agressivo em caso de presença de múltiplos nódulos. Os dados de idade e tamanho estão expressos em média $\pm \sigma$ (desvio padrão).

5.2 ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE

As 57 amostras tumorais, obtidas no levantamento sequencial, foram submetidas à análise histopatológica por 5 patologistas veterinários distintos, nas quais houve concordância total entre todos os patologistas em 22 (38,6%) casos, com 18 (31,6%) casos concordantes para o diagnóstico de adenoma, 3 (5,3%) casos concordantes para carcinoma e 1 (1,8%) caso concordante para hiperplasia nodular. Para 21 (36,8%) casos, houve concordância entre apenas 4 patologistas, sendo 9 (15,8%) casos de adenoma, 11 (19,3%) casos de carcinoma e 1 (1,8%) caso de hiperplasia nodular. Houve concordância entre apenas 3 patologistas para 13 (22,8%) casos, sendo 2 (3,5%) casos de adenoma, 10 (17,5%) casos de carcinoma e 1 (1,8%) caso de epitelioma. Em 1 (1,8%) dos casos, 2 patologistas concordaram com o diagnóstico de adenoma, 2 concordaram com o diagnóstico de carcinoma e 1 diagnosticou como hiperplasia nodular.

Considerando a classificação diagnóstica dicotômica (adenomas e hiperplasias como tumores benignos; carcinomas e epiteliomas como tumores malignos), houve concordância total entre todos os patologistas para 32/57 (56,1%) casos, com 24 (42,1%) casos concordantes para o diagnóstico de tumor benigno e 8 (14%) casos concordantes para tumor maligno. Houve concordância de somente 4 patologistas em 13 (22,8%) casos, sendo 5 (8,8%) casos diagnosticados como tumores benignos e 8 (14%) como tumores malignos. Por fim, para 12 (21,1%) casos, houve concordância apenas entre 3 patologistas, com 3 (5,3%) casos de tumores benignos e 9 (15,8%) casos de tumores malignos.

Ao comparar os diagnósticos entre os 5 patologistas, houve uma variação importante entre a proporção das diferentes classificações. Dentre os tumores benignos, a frequência do diagnóstico de hiperplasia variou de 2 a 3 casos (3,5% a 5,3%) e de adenoma variou de 25 a 35 casos (43,9% a 61,4%). Dentre os tumores malignos, a frequência diagnóstica variou de 0 a 5 casos (0 a 8,8%) para os epiteliomas e de 12 a 27 casos (21,1% a 47,4%) para os carcinomas. Considerando a classificação dicotômica, foram diagnosticados tumores benignos em 28 a 42 casos (49,1% a 73,7%) e tumores malignos em 15 a 29 casos (26,3% a 50,9%) (Figura 4).

De um total de 3420 parâmetros morfológicos avaliados ($n_{patologistas} \times n_{parâmetros} \times n_{casos}$), houve preenchimento de 3371 (98,65%) parâmetros pelos patologistas participantes do estudo. As omissões foram consideradas aleatórias e excluídas das análises de concordância e árvores de regressão. Não houve omissões para as classificações diagnósticas.

Com relação à experiência dos patologistas incluídos no estudo, o patologista

Figura 4: Gráficos de barras: frequências de diagnóstico por patologista

(A) Frequência de diagnósticos por patologista (P1, P2, P3, P4 e P7) estratificados pelas 4 classificações diagnósticas (hiperplasia, adenoma, epitelioma e carcinoma). (B) Frequência de diagnósticos por patologista estratificados em 2 categorias (tumores benignos vs. tumores malignos). As percentagens são referentes ao percentual de neoplasias malignas diagnosticadas por patologista.

P1 relatou experiência de 5,5 anos em patologia veterinária (no momento da primeira avaliação), com estimativa de 99,4% de carga de trabalho com patologia cirúrgica de pequenos animais. O patologista P2 relatou experiência de 7 meses em patologia veterinária (no momento da primeira avaliação), com estimativa de 80,0% de carga de trabalho com patologia cirúrgica de pequenos animais. O patologista P3 relatou experiência de 5 anos em patologia veterinária, com estimativa de 50,0% de carga de trabalho com patologia cirúrgica de pequenos animais. O patologista P4 relatou experiência de 5,5 anos em patologia veterinária, com estimativa de 16,7% de carga de trabalho com patologia cirúrgica de pequenos animais. Por fim, o patologista P7 relatou experiência de 17 anos em patologia veterinária, com estimativa de 74,5% de carga de trabalho com patologia cirúrgica de pequenos animais.

Em análise de concordância para as classificações diagnósticas entre os patologistas, foi observada concordância razoável para comparações tanto em 4 categorias (hiperplasia, adenoma, epitelioma e carcinoma, ICC=0,54) quanto em 2 categorias (benigno e maligno, κ =0,54)(Tabela 2). Na análise intraobservador, foi observada concordância excelente para um dos patologistas (P1xP5: ICC=0,83, κ =0,83), e concordância razoável para o outro (P2xP6: ICC=0,57, κ =0,50)(Tabela 3).

Ao comparar os valores médios obtidos a partir das análises dos critérios morfológicos dos 5 patologistas, foi observada uma concordância boa para a contagem de mitoses/2,37mm² (ICC=0,60), e concordância razoável para atipia celular (ICC=0,40),

Tabela 2: Concordância entre diferentes patologistas no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores			
	4 categorias		2 categorias	
	ICC	<i>p</i>	κ	<i>p</i>
P1xP2	0,72	<0,0001	0,72	<0,0001
P1xP3	0,46	0,0016	0,51	<0,0001
P1xP4	0,56	<0,0001	0,58	<0,0001
P1xP7	0,68	<0,0001	0,62	<0,0001
P2xP3	0,49	<0,0001	0,52	<0,0001
P2xP4	0,45	0,0002	0,47	0,0004
P2xP7	0,66	<0,0001	0,60	<0,0001
P3xP4	0,40	0,0006	0,52	<0,0001
P3xP7	0,47	0,0002	0,43	0,0005
P4xP7	0,50	<0,0001	0,45	0,0006
Média (σ)	0,54	($\pm 0,11$)	0,54	($\pm 0,09$)
Mediana (IIQ)	0,49	(0,46 - 0,63)	0,52	(0,48 - 0,59)

Fonte: WASQUES, 2018

A avaliação de concordância em 4 categorias considera os diferentes diagnósticos de hiperplasia, adenoma, epiteloma e carcinoma em uma escala ordinal crescente, por coeficiente de correlação intraclasse (ICC). A avaliação de concordância em 2 categorias considera apenas concordância entre tumores benignos (hiperplasia + adenoma) e malignos (epitelioma + carcinomas) por coeficiente de κ de Cohen. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 3: Concordância entre mesmos patologistas no diagnóstico de tumores de glândula hepatoide - São Paulo - 2018

	Concordância intraobservadores			
	4 categorias		2 categorias	
	ICC	<i>p</i>	κ	<i>p</i>
P1xP5	0,83	<0,0001	0,83	<0,0001
P2xP6	0,57	<0,0001	0,50	<0,0001
Média (σ)	0,70	($\pm 0,19$)	0,66	($\pm 0,23$)
Mediana (IIQ)	0,70	(0,63 - 0,76)	0,66	(0,58 - 0,74)

Fonte: WASQUES, 2018

A avaliação de concordância em 4 categorias considera os diferentes diagnósticos de hiperplasia, adenoma, epiteloma e carcinoma em uma escala ordinal crescente, por coeficiente de correlação intraclasse (ICC). A avaliação de concordância em 2 categorias considera apenas concordância entre tumores benignos (hiperplasia + adenoma) e malignos (epitelioma + carcinomas) por coeficiente de κ de Cohen. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

perda de polaridade celular (ICC=0,40), proporção de células de reserva (ICC=0,43), diferenciação sebácea (ICC=0,43) e presença de atipia mitótica ($\kappa=0,42$)(Tabelas 4 a 9). Para os demais critérios, a concordância média obtida foi considerada ruim (Tabelas 10 a 13). Para o critério de invasão vascular, não foi possível obter significância estatística em análise de concordância devido à baixa ocorrência deste critério nos casos levantados, e seu grau de concordância não pôde ser aferido com segurança (Tabela 14). As tabelas 15 e 16 mostram as concordâncias médias dos critérios morfológicos e classificações diagnósticas listadas em ordem decrescente.

Tabela 4: Concordância entre diferentes patologistas na contagem de mitoses em 2,37mm²) - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Contagem de mitoses (/2,37mm ²)	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,70	0,0041
P1xP3	0,63	<0,0001
P1xP4	0,59	0,0001
P1xP7	0,78	<0,0001
P2xP3	0,38	0,0135
P2xP4	0,29	0,0459
P2xP7	0,47	0,0144
P3xP4	0,65	0,0007
P3xP7	0,79	<0,0001
P4xP7	0,75	0,0002
Média (σ)	0,60	($\pm 0,17$)
Mediana (IIQ)	0,64	(0,50 - 0,74)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclassa. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Ao avaliar o impacto da correção da contagem de mitoses por área na concordância entre os observadores, foi observada uma diminuição da concordância após esta correção, com ICC médio de 0,63 para a contagem de mitoses por campo (entre patologistas que utilizaram microscópicos com número de campo distintos), e ICC médio de 0,55 para contagem de mitoses/2,37mm² ($d=2,58$. $p=0,0087$)(Figura 5A). No entanto, foi observada uma correlação negativa moderada entre o número de campo de ocular e a contagem de mitoses ($\rho=-0,43$, $p<0,0001$), havendo coincidência entre patologistas propensos a atribuir um maior valor de contagem de mitoses e o uso de microscópios com menor área de campo (Figura 5B).

A partir da análise de árvore de regressão, foram obtidos 2 algoritmos diagnósticos que permitiram uma melhora da concordância interobservador para a distinção entre tumores benignos e malignos (Figuras 6 e 7). Os padrões "ouro" utilizados para a confecção dos desfechos destes algoritmos foram a atribuição de malignidade

Tabela 5: Concordância entre diferentes patologistas na classificação da atipia celular - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Atipia celular - 12 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,52	<0,0001
P1xP3	0,31	0,0081
P1xP4	0,32	0,0058
P1xP7	0,60	<0,0001
P2xP3	0,30	0,0218
P2xP4	0,30	0,0092
P2xP7	0,53	0,0017
P3xP4	0,26	0,0187
P3xP7	0,47	0,0001
P4xP7	0,36	0,0044
Média (σ)	0,40	($\pm 0,12$)
Mediana (IIQ)	0,34	(0,30 - 0,51)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclass. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 6: Concordância entre diferentes patologistas na classificação da perda de polaridade celular - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Perda de polaridade - 12 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,46	0,0001
P1xP3	0,36	0,0427
P1xP4	0,50	0,0062
P1xP7	0,80	<0,0001
P2xP3	0,28	0,0264
P2xP4	0,32	0,0060
P2xP7	0,35	0,0057
P3xP4	0,30	0,0086
P3xP7	0,32	0,0278
P4xP7	0,35	0,0056
Média (σ)	0,40	($\pm 0,16$)
Mediana (IIQ)	0,35	(0,32 - 0,43)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclass. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 7: Concordância entre diferentes patologistas na classificação da proporção de células de reserva - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Proporção de células de reserva - 4 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,19	0,0787
P1xP3	0,56	<0,0001
P1xP4	0,61	<0,0001
P1xP7	0,64	<0,0001
P2xP3	0,16	0,1143
P2xP4	0,44	0,0004
P2xP7	0,22	0,0447
P3xP4	0,68	<0,0001
P3xP7	0,36	0,0026
P4xP7	0,41	0,0006
Média (σ)	0,43	($\pm 0,19$)
Mediana (IIQ)	0,43	(0,26 - 0,60)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclass. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 8: Concordância entre diferentes patologistas na classificação de diferenciação sebácea - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Diferenciação sebácea - 3 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,31	0,0067
P1xP3	0,48	<0,0001
P1xP4	0,60	<0,0001
P1xP7	0,47	0,0001
P2xP3	0,30	0,0176
P2xP4	0,39	0,0011
P2xP7	0,31	0,0071
P3xP4	0,50	<0,0001
P3xP7	0,44	0,0002
P4xP7	0,52	<0,0001
Média (σ)	0,43	($\pm 0,1$)
Mediana (IIQ)	0,45	(0,33 - 0,44)

Fonte: WASQUES, 2018

σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 9: Concordância entre diferentes patologistas na classificação de atipia mitótica - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Atipia mitótica - 2 categorias	
	κ	p
P1xP2	0,62	<0,0001
P1xP3	0,54	<0,0001
P1xP4	0,38	0,0036
P1xP7	0,21	0,0475
P2xP3	0,56	<0,0001
P2xP4	0,51	0,0001
P2xP7	0,33	0,0010
P3xP4	0,40	0,0014
P3xP7	0,27	0,0034
P4xP7	0,37	0,0012
Média (σ)	0,42	($\pm 0,14$)
Mediana (IIQ)	0,39	(0,34 - 0,53)

Fonte: WASQUES, 2018

σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 10: Concordância entre diferentes patologistas na classificação do grau de infiltração - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Grau de infiltração - 4 categorias	
	ICC	p
P1xP2	0,23	0,03
P1xP3	0,65	<0,0001
P1xP4	0,14	0,12
P1xP7	0,46	0,00
P2xP3	0,24	0,03
P2xP4	0,21	0,05
P2xP7	0,15	0,09
P3xP4	0,08	0,25
P3xP7	0,50	<0,0001
P4xP7	0,22	0,04
Média (σ)	0,29	($\pm 0,18$)
Mediana (IIQ)	0,22	(0,16 - 0,40)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclass. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 11: Concordância entre diferentes patologistas na classificação da necrose tumoral - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Necrose tumoral - 4 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,32	0,0066
P1xP3	0,58	<0,0001
P1xP4	0,30	0,0117
P1xP7	0,44	0,0002
P2xP3	0,40	0,0007
P2xP4	0,39	0,0012
P2xP7	0,30	0,0095
P3xP4	0,21	0,0606
P3xP7	0,44	0,0003
P4xP7	0,15	0,1379
Média (σ)	0,35	($\pm 0,13$)
Mediana (IIQ)	0,36	(0,3 – 0,43)

Fonte: WASQUES, 2018

ICC: coeficiente de correlação intraclass. σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 12: Concordância entre diferentes patologistas na classificação de diferenciação escamosa - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Diferenciação escamosa - 3 categorias	
	ICC	<i>p</i>
P1xP2	0,30	0,0090
P1xP3	0,21	0,0417
P1xP4	0,14	0,1079
P1xP7	0,25	0,0518
P2xP3	0,22	0,0520
P2xP4	0,12	0,1797
P2xP7	0,25	0,0228
P3xP4	0,32	0,0080
P3xP7	0,23	0,0333
P4xP7	0,26	0,0248
Média (σ)	0,23	($\pm 0,06$)
Mediana (IIQ)	0,24	(0,21 - 0,26)

Fonte: WASQUES, 2018

σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 13: Concordância entre diferentes patologistas na classificação de mitoses em células diferenciadas - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Mitose em células diferenciadas - 2 categorias	
	κ	p
P1xP2	0,30	0,0128
P1xP3	0,28	0,0151
P1xP4	0,15	0,2195
P1xP7	0,47	0,0003
P2xP3	0,21	0,0133
P2xP4	0,22	0,0251
P2xP7	0,34	0,0021
P3xP4	0,37	0,0053
P3xP7	0,48	0,0001
P4xP7	0,42	0,0015
Média (σ)	0,32	($\pm 0,11$)
Mediana (IIQ)	0,32	(0,23 - 0,40)

Fonte: WASQUES, 2018

σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 14: Concordância entre diferentes patologistas na classificação de invasão vascular - São Paulo - 2018

	Concordância entre observadores	
	Invasão vascular - 2 categorias	
	κ	p
P1xP2	-0,03	0,8431
P1xP3	0,49	<0,0001
P1xP4	-0,03	0,8431
P1xP7	0,00	1,0000
P2xP3	-0,03	0,8400
P2xP4	0,48	0,0006
P2xP7	0,00	1,0000
P3xP4	-0,05	0,7212
P3xP7	0,00	NA
P4xP7	0,00	1,0000
Média (σ)	0,08	($\pm 0,21$)
Mediana (IIQ)	0,00	(-0,02 - 0)

Fonte: WASQUES, 2018

σ : desvio padrão. IIQ: intervalo interquartil.

Tabela 15: Concordância média entre patologistas com relação a diferentes critérios - variáveis binárias - São Paulo - 2018

	κ (média)
Diagnóstico (benigno x maligno)	0,54
Atipia mitótica	0,42
Mitoses em células diferenciadas	0,32
Invasão vascular	0,08*

Fonte: WASQUES, 2018

* A maioria das comparações entre patologistas com relação ao critério de invasão vascular não atingiu significância estatística, devido à baixa ocorrência deste critério em meio aos casos estudados.

Tabela 16: Concordância média entre patologistas com relação a diferentes critérios - variáveis ordinais/contínuas - São Paulo - 2018

	ICC(média)
Contagem de mitoses (/2,37mm ²)	0,60
Diagnóstico (4 categorias)	0,54
Diferenciação sebácea	0,43
Proporção de células de reserva	0,43
Perda de polaridade	0,40
Atipia celular	0,40
Necrose tumoral	0,35
Grau de infiltração	0,29
Diferenciação escamosa	0,23

Fonte: WASQUES, 2018

Figura 5: Impacto da correção por área na concordância de contagem de mitoses

Fonte: WASQUES, 2018

(A) O valor p é referente ao teste t pareado. d : tamanho de efeito (d de Cohen). DM: diferença de médias.

(B) O valor p é referente ao teste de correlação de Spearman. ρ : ρ de Spearman.

para os casos com pelo menos 60% de concordância entre os 5 patologistas quanto ao diagnóstico de tumor maligno (Algoritmo 1), e a atribuição de malignidade para casos com pelo menos 50% de concordância em tumor maligno entre os 4 patologistas mais experientes (Algoritmo 2).

Figura 6: Algoritmo diagnóstico 1

Fonte: WASQUES, 2018

Ao aplicar os critérios de classificação estabelecidos pelos algoritmos diagnósticos 1 e 2 às avaliações dos parâmetros morfológicos realizadas por cada patologista (Quadro 4), e reavaliando a concordância diagnóstica entre eles, foi observada uma melhora significativa na concordância. Com a aplicação do algoritmo 1, foi observada uma melhora de concordância razoável ($\kappa=0,54$) para concordância boa ($\kappa=0,64$; $d=1,18$; $p=0,0046$)(Figura 8A). De maneira semelhante, a aplicação do algoritmo 2 demonstrou uma melhora de concordância razoável ($\kappa=0,54$) para concordância boa ($\kappa=0,65$; $d=1,12$; $p=0,0065$)(Figura 8B). Foi observada uma melhora da reprodutibilidade em todos os pares de comparação após a aplicação de ambos os algoritmos, em intensidades variáveis, com exceção do par P3xP4, que demonstrou uma piora da concordância com o uso dos 2 algoritmos.

Figura 7: Algoritmo diagnóstico 2

Fonte: WASQUES, 2018

Figura 8: Impacto dos algoritmos diagnósticos na concordância interobservador

Fonte: WASQUES, 2018

Os valores p são referentes ao teste t pareado. d : tamanho de efeito (d de Cohen). DM : diferença de médias.

5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Do total de 78 lesões tumorais incluídas no estudo imuno-histoquímico, após avaliação dos parâmetros de qualidade e controles internos, a imunomarcagem de vimentina foi considerada adequada para análise em 74 (94,9%) amostras. Ainda, foi possível avaliar o tecido glandular não tumoral adjacente como grupo controle em 63 (80,8%) amostras. Na imunoexpressão de pancitoqueratina, foi possível avaliar 63 (80,8%) lesões tumorais e 55 (70,5%) amostras de tecido glandular adjacente. Por fim, a imunoexpressão de E-caderina foi considerada adequada para análise em 68 (87,2%) lesões tumorais e 57 (73,1%) amostras de tecido adjacente. Para a análise de Ki-67, foram considerados adequados para a análise 64 (82,1%) casos.

A imunoexpressão de vimentina, representada como marcação citoplasmática granular a grosseira, foi observada na maioria das lesões tumorais. De forma geral, apresentou-se mais intensamente marcada em células de reserva em comparação com células diferenciadas. Em 44/74 (59,5%) casos, predominou o padrão de marcação citoplasmático em células de reserva (Figura 9A), enquanto que 20/74 (27%) casos demonstraram um predomínio de marcação membranar (Figura 9B). Nas células diferenciadas, houve o predomínio de marcação citoplasmática em 44/74 (59,5%) casos, enquanto o padrão de membrana predominou em 14/74 (18,9%) casos. Uma menor proporção dos casos (6/74; 8,1%) demonstrou predomínio de marcação citoplasmática com distribuição perinuclear em células diferenciadas (Figura 9A). Em 10/74 (13,5%) casos não foi observada imunomarcagem de vimentina em células neoplásicas.

De modo geral, foram observados escores mais elevados da marcação de vimentina em tumores malignos em comparação com tumores benignos e glândulas hepatoides normais. Em alguns tumores benignos, com escores mais baixos, a marcação de vimentina evidenciou apenas as células mesenquimais do estroma fibroso tumoral, demarcando os lóbulos com células neoplásicas negativas (Figura 9C). Em alguns tumores era evidente a transição de áreas neoplásicas negativas para áreas com expressão marcante de vimentina (Figura 9D). Em tecido glandular não neoplásico adjacente, foi observada marcação em células de reserva em 22/63 (34,9%) casos, sendo a maioria (95,5%) com padrão predominantemente citoplasmático. Em células diferenciadas, foi observada expressão de vimentina em 40/63 (63,5%) casos, com predomínio do padrão citoplasmático em 92,5% dos casos. Estas marcações em tecido não neoplásico adjacente foram, usualmente, observadas em menor intensidade e extensão em comparação ao tecido tumoral (mesmo em comparação com os tumores com escores menores).

Figura 9: Padrões de expressão imuno-histoquímica de vimentina em tumores hepatoides

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Carcinoma. Observa-se marcação citoplasmática intensa em células de reserva, membranar a citoplasmática granular/difusa, além de marcação citoplasmática granular moderada em células diferenciadas, em algumas delas com padrão de marcação perinuclear mais intenso. (B) Carcinoma. Observa-se padrão de marcação membranar, mais notadamente em células de reserva, com marcação citoplasmática granular menos intensa. (C) Adenoma. Marcação positiva delineando as células mesenquimais presentes no estroma tumoral, porém com células neoplásicas negativas. (D) Carcinoma. Transição entre área com marcante expressão de vimentina em células neoplásicas e área negativa para vimentina. Imuno-histoquímica para vimentina (Clone V9), com revelação por DAB e contra-coloração em hematoxilina de Harris.

A imunomarcção de pancitoqueratina apresentou-se, predominantemente, citoplasmática granular a difusa em lesões tumorais, com maior intensidade em células de reserva (50/63; 79,4%) e menor intensidade em células diferenciadas (37/63; 58,7%) (Figura 10A). Pontos com diferenciação escamosa demonstraram uma marcação relativamente mais intensa do que as células de reserva e diferenciadas, mas estas áreas não foram consideradas para inclusão no escore final. Foi também observado um padrão predominante de marcação membranar em células diferenciadas (26/63; 41,3%) e em células de reserva (13/63; 20,6%). Raramente foi observada marcação com distribuição perinuclear em células diferenciadas, porém este não se caracterizou como padrão predominante em nenhum dos casos. Um padrão de marcação semelhante foi observado em tecido glandular não neoplásico adjacente, com predomínio do padrão citoplasmático em células de reserva (53/55; 96,4%) e em células diferenciadas (34/55; 61,8%). Em alguns casos foram observadas áreas neoplásicas com perda total ou subtotal da expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas, em comparação com o tecido glandular adjacente, porém mantendo-se a expressão em células de reserva (Figura 10B e Figura 10C).

A imunomarcção da E-caderina foi observada em glândulas hepatoides normais como marcação membranar forte em células diferenciadas, e marcação membranar menos intensa em células de reserva (Figura 11A). Nestas, foi observada marcação polarizada, ou seja, marcação nas membranas laterais e apicais, sendo geralmente ausente em membrana basal. De modo geral, em neoplasias com marcação presente em células de reserva, foi observado padrão de marcação polarizada semelhante, mas em alguns casos foi observada um padrão distinto, com marcação membranar também em domínio basal (Figura 11B). Em tumores benignos e bem diferenciados, foi observada manutenção de marcação membranar em células diferenciadas e em células de reserva (Figura 11C). Algumas neoplasias demonstraram perda de expressão de E-caderina, manifestando-se mais frequentemente como perda de expressão ou intensidade em células de reserva e, menos frequentemente, em células diferenciadas (Figura 11D). Alguns casos (27/68; 39,7%) demonstraram raras células diferenciadas com padrão de marcação citoplasmática intenso e difuso (Figura 11E), observada em quantidades variáveis. Padrão semelhante de marcação citoplasmática também foi observada em tecido glandular não neoplásico adjacente (9/57; 15,5%), geralmente em menor quantidade em comparação às lesões tumorais. As células neoplásicas multinucleadas demonstraram, frequentemente, marcação membranar pela E-caderina (Figura 11F). A tabela 17 demonstra os escores médios e medianos de imunoexpressão de vimentina, pancitoqueratina e E-caderina para os diferentes grupos diagnósticos.

Figura 10: Padrões de expressão imuno-histoquímica de pancitoqueratina em tumores hepatoides

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Adenoma. Observa-se marcação citoplasmática mais intensa em células de reserva, e em menor intensidade em células diferenciadas. (B) Carcinoma. Área extensa de atipia celular demonstrando perda da imunomarcação de pancitoqueratina (*). (C) Carcinoma. Área de transição entre glândulas hepatoides normais, com expressão preservada de pancitoqueratina em células diferenciadas (n), e tecido tumoral (carcinoma), demonstrando perda de expressão da pancitoqueratina em células diferenciadas (*), e marcação preservada na maioria de células de reserva. Imuno-histoquímica para pancitoqueratina (clone AE1/AE3), com revelação por DAB e contra-coloração em hematoxilina de Harris.

Figura 11: Padrões de expressão imuno-histoquímica de E-caderina em tumores hepatoides

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Glândulas normais adjacentes às lesões tumorais, com marcação membranar em células diferenciadas e em células de reserva. *: glândula apócrina. (B) Carcinoma. Área com elevação da proporção de células de reserva, com marcação membranar intensa. (C) Adenoma. Marcação membranar forte em células diferenciadas, e em menor intensidade em células de reserva. (D) Carcinoma. Área de marcante perda de expressão de E-caderina, mais notadamente em células de reserva. (E) Carcinoma. Marcação citoplasmática intensa e difusa em célula diferenciada (seta). (F) Carcinoma. Células tumorais multinucleadas com marcação membranar e perda da expressão de E-caderina em células de reserva. Imuno-histoquímica para E-caderina (clone 4A2C7), com revelação por DAB e contra-coloração em hematoxilina de Harris.

Tabela 17: Escores de marcação imuno-histoquímica entre os diferentes grupos diagnósticos - São Paulo - 2018

	Escore - média (mediana [intervalo interquartil])		
	vimentina	AE1/AE3	E-caderina
Glândulas normais			
Células de reserva	0,83 (0 [0 - 1])	19,47 (21 [21 - 21])	19,42 (21 [21 - 21])
Células diferenciadas	1,1 (1 [0 - 2])	12,29 (14 [10,5 - 14])	20,72 (21 [21 - 21])
Tumores benignos			
Células de reserva	4,54 (1 [0 - 7])	19,7 (21 [21 - 21])	15,88 (21 [12 - 21])
Células diferenciadas	1,12 (1 [0 - 1])	11,37 (14 [7 - 14])	20,62 (21 [21 - 21])
Tumores malignos			
Células de reserva	10,37 (12 [4 - 15])	19,32 (21 [18 - 21])	11,04 (10 [6 - 14])
Células diferenciadas	2,44 (2 [1 - 3])	8,08 ([4 - 14])	18,6 (21 [18 - 21])
Tumores vasculoinvasivos			
Células de reserva	8,76 (6 [2 - 15])	18,82 (21 [18 - 21])	8,94 (10 [3 - 12])
Células diferenciadas	3,86 (2 [2 - 6])	7,18 (6 [4,5 - 9,5])	17,12 (18 [15 - 21])

Fonte: WASQUES, 2018

Dentre os 32 tumores malignos com infiltração em estroma, avaliados em exame imuno-histoquímico, foi observada expressão de vimentina em ao menos algumas áreas das frentes invasivas em 23 (71,9%) casos (Figura 12A). Para alguns casos com invasão vascular, foi observada presença de marcação citoplasmática de vimentina em células neoplásicas intravasculares (Figura 12B). Para pancitoqueratina, foi observada perda de expressão ou diminuição de intensidade em relação ao tecido adjacente em 8/26 (30,8%) casos nas frentes invasivas (figura 12C). Para E-caderina, foi observada perda ou diminuição de expressão em frentes invasivas em 17 dos 29 casos invasivos avaliados (58,6%) (Figura 12D).

Das 78 lesões tumorais, 50 (64,1%) demonstraram ao menos algumas áreas com morfologia celular fusiforme. A maioria (33/78; 42,3%) não demonstrou mais do que 10% de área tumoral de aspecto fusocelular, com exceção de alguns poucos casos, como 5 casos com 31-40% de área tumoral com morfologia fusiforme e 1 caso com 41-50%. Dos casos com reação de vimentina disponível, 38/49 (77,6%) demonstraram expressão de vimentina em ao menos algumas áreas com aspecto fusiforme (Figura 13A e B). Com relação à E-caderina, 16/43 (37,2%) demonstraram perda de expressão em ao menos algumas áreas com aspecto fusiforme (Figura 13C e D). Com relação à pancitoqueratina, 7/40 (17,5%) demonstraram perda de expressão em ao menos algumas áreas com aspecto fusiforme.

Dos 61 casos com ambas as reações de vimentina e pancitoqueratina disponíveis, 5 (8,2%) apresentaram coincidência de áreas expressando vimentina com áreas demonstrando perda de expressão de pancitoqueratina. De 67 casos com as reações

Figura 12: Expressão imuno-histoquímica em frentes de invasão estromal e invasão vascular

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Carcinoma, vimentina (V9). Há expressão de vimentina por células neoplásicas em frente invasiva (setas). *: células inflamatórias estromais. ad: tecido adiposo. (B) Carcinoma, vimentina, imuno-histoquímica. Êmbolo de células neoplásicas em vaso linfático (*), com expressão citoplasmática de vimentina. (C) Carcinoma, pancitoqueratina (AE1/AE3). Grupo de células epiteliais demonstrando perda de expressão de pancitoqueratina em área invasiva (seta). (D) Carcinoma, E-caderina (4A2C7). Há diminuição da intensidade de expressão de E-caderina em bordo infiltrativo (seta), em comparação ao tecido tumoral adjacente. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e contra-coloração em hematoxilina de Harris.

Figura 13: Expressão de marcadores imuno-histoquímicos em áreas com células neoplásicas de morfologia fusiforme

Fonte: WASQUES, 2018

(A) Carcinoma, vimentina (V9). Área com morfologia marcadamente fusiforme e com intensa expressão de vimentina em células neoplásicas. (B) Carcinoma, E-caderina. Células de reserva de aspecto fusiforme e com concomitante perda de expressão membranar de E-caderina (setas). (C) Carcinoma, vimentina (V9). Células neoplásicas de aspecto poligonal a fusiforme, com marcante expressão de vimentina citoplasmática. (D) Carcinoma, E-caderina (4A2C7). Transição de área com células neoplásicas demonstrando aspecto epitelióide (*) para áreas com células de aspecto mais fusiforme (setas), com marcação membranar fraca de E-caderina. Imuno-histoquímica com revelação por DAB e contra-coloração em hematoxilina de Harris.

de vimentina e E-caderina, 30 (44,8%) apresentaram coincidência de áreas expressando vimentina com áreas demonstrando perda de E-caderina (Figura 14A e B). De 59 casos com as reações de pancitoqueratina e E-caderina, apenas 1 (1,7%) demonstrou áreas coincidentes com perda de expressão de pancitoqueratina e E-caderina. De 59 casos com as 3 reações disponíveis, apenas 1 (1,7%) demonstrou coincidência de áreas com perda da expressão de pancitoqueratina e E-caderina com áreas de expressão de vimentina.

Figura 14: Comparação entre marcadores imuno-histoquímicos em adenoma de glândula hepatoide

Fonte: WASQUES, 2018

Adenoma: comparação topográfica da imunoexpressão de vimentina e E-caderina em uma mesma lesão tumoral. As áreas de expressão de vimentina (A) em células de reserva (*) coincidem com as áreas de perda de expressão de E-caderina (B) em uma mesma região deste tumor (*).

A análise imuno-histoquímica de Ki-67 demonstrou marcação nuclear observada predominantemente em células de reserva. De modo geral, a taxa de proliferação celular foi maior em tumores malignos em comparação com tumores benignos, embora alguma sobreposição tenha sido observada. Não foram detectadas células neoplásicas multinucleadas com expressão nuclear de ki-67. Considerando todas as lesões tumorais, o valor médio da taxa de proliferação celular foi de 11,7% ($\pm 8,6$), com mediana de 9,5% (intervalo interquartil: 6-14,3%). Para os tumores benignos, foi observada uma taxa de proliferação média de 7% (intervalo interquartil: 3,4-8,1%). Para os tumores malignos, a taxa média de proliferação foi de 16% (intervalo interquartil: 7,7-21,8%). Por fim, para os tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos, o valor médio obtido foi de 13% (intervalo interquartil: 8,2 - 14,7%). A tabela 18 demonstra os escores médios e medianos de escore de morfologia fusiforme, contagem de células com imunoexpressão de E-caderina citoplasmática, contagem de mitoses e taxa de proliferação (Ki67) para os diferentes grupos diagnósticos.

Tabela 18: Escores de morfologia fusiforme, contagem de células com expressão de E-caderina citoplasmática e marcadores de proliferação - São Paulo - 2018

	morfologia fusiforme	Escore - média (mediana [intervalo interquartil])			
		E-caderina citoplasmática (/2,37mm²)	mitoses (/2,37mm²)	ki67(%)	
Glândulas normais	NA	0,65 (0 [0 - 0])	NA	NA	NA
Tumores benignos	0,43 (0 [0 - 1])	3,4 (0 [0 - 0,9])	2,9 (1,8 [1,2 - 5,1])	7 (5,5 [3,4 - 8,1])	
Tumores malignos	1,46 (1 [1 - 2])	5,13 (1,2[0 - 3,6])	18,9 (12,1 [8,5 - 19,3])	16 (13,7[7,7 - 21,8])	
Tumores vasculoinvasivos	1,43 (1 [1 - 2])	1,71 (0 [0 - 1,2])	18,41 (16,9[6,9 - 25,3])	13 (10,9[8,2 - 14,7])	

Fonte: WASQUES, 2018
NA=Não avaliado

Ao comparar a distribuição dos diferentes marcadores imuno-histoquímicos e morfológicos associados à transição epitélio-mesenquimal e atividade proliferativa, foram observadas algumas diferenças entre os diferentes grupos diagnósticos. Em relação à expressão de vimentina em células de reserva, observou-se uma diferença forte de distribuição entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,76, p < 0,0001$) e entre glândulas normais e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,62, p < 0,0001$), além de uma diferença moderada entre glândulas normais e tumores benignos ($r = 0,37, p = 0,0018$), entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,47, p = 0,0013$) e entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,35, p = 0,0430$). Para a expressão de vimentina em células diferenciadas, houve diferença forte de distribuição entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,59, p < 0,0001$), e diferença moderada entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,35, p = 0,0025$), entre glândulas normais e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,50, p < 0,0001$), e entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,42, p < 0,0057$)(Figura 15A e B, Tabela 19).

Com relação à expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas, foi observada uma diferença forte de distribuição entre glândulas normais e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,52, p = 0,0001$), e uma diferença moderada entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,44, p = 0,0003$), entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,36, p = 0,0293$), e entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,49, p = 0,0087$)(Figura 15C e D, Tabela 19).

Para a expressão de E-caderina em células de reserva, foi observada forte diferença de distribuição entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,66, p < 0,0001$), entre glândulas normais e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,74, p < 0,0001$), entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,52, p = 0,0015$), e moderada diferença entre glândulas normais e tumores benignos ($r = 0,35, p = 0,0061$) e entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,39, p = 0,0140$). A expressão de E-caderina em células diferenciadas demonstrou forte diferença de distribuição entre glândulas normais e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,66, p < 0,0001$), entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,59, p = 0,0004$), além de moderada diferença entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,46, p = 0,0003$) e entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,38, p = 0,0216$). (Figura 15E e F, Tabela 19). Para a contagem de células com expressão de E-caderina citoplasmática, foi observada apenas uma moderada diferença de distribuição entre glândulas normais e tumores malignos ($r = 0,46, p = 0,0001$)(Figura 16A, Tabela 20).

Tabela 19: Comparações entre os diferentes grupos diagnósticos e a expressão de marcadores imuno-histoquímicos - São Paulo - 2018

	VIMRES		VIMDIF		PANRES		PANDIF		ECDRES		ECDDIF	
	p <0,0001 ^{kw}	r	p <0,0001 ^{kw}	r	p 0,7626 ^{kw}	r	p <0,0001 ^{kw}	r	p <0,0001 ^{kw}	r	p <0,0001 ^{kw}	r
NORM vs. BEN	0,0018	0,37	1,0000	0,01	NA	NA	0,9070	0,11	0,0061	0,35	1,0000	0,09
NORM vs. MAL	<0,0001	0,76	0,0025	0,35	NA	NA	0,0003	0,44	<0,0001	0,66	0,0003	0,46
NORM vs. INV/MET	<0,0001	0,62	<0,0001	0,50	NA	NA	0,0001	0,52	<0,0001	0,74	<0,0001	0,66
BEN vs. MAL	0,0013	0,47	0,0057	0,42	NA	NA	0,0293	0,36	0,0140	0,39	0,0216	0,38
BEN vs. INV/MET	0,0430	0,35	<0,0001	0,59	NA	NA	0,0087	0,49	0,0015	0,52	0,0004	0,59
MAL vs. INV/MET	1,0000	0,13	0,1676	0,28	NA	NA	1,0000	0,09	1,0000	0,14	0,4056	0,23

Fonte: WASQUES, 2018

NORM: Glândulas normais. BEN: Tumores benignos (adenomas e hiperplasias nodulares). MAL: Tumores malignos (carcinomas e epitelíomas), sem invasão vascular ou metástase. INV/MET: Tumores malignos (carcinomas) com invasão vascular e/ou metástase. VIMRES: Escore de vimentina em células de reserva. VIMDIF: Escore de vimentina em células diferenciadas. PANRES: Escore de pancitqueratina em células de reserva. PANDIF: Escore de pancitqueratina em células diferenciadas. ECDRES: Escore de E-caderina em células de reserva. ECDDIF: Escore de E-caderina em células diferenciadas. Os valores de p correspondem a testes de Wilcoxon-Mann Whitney com correção de Bonferroni, exceto aqueles identificados com ^{kw}, que correspondem aos valores p de testes de Kruskal Wallis. O valor r corresponde ao tamanho de efeito ($r \geq 0,5$: efeito grande. $r \geq 0,3$: efeito médio. $r \geq 0,1$: pequeno efeito). NA: resultado não disponível.

O escore de morfologia fusiforme mostrou forte diferença entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,51$, $p = 0,0005$), e moderada diferença entre tumores benignos e malignos ($r = 0,46$, $p = 0,0006$)(Figura 16B, Tabela 20). Em relação à atividade proliferativa das lesões em estudo, foi observada forte diferença da contagem de mitoses entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,77$, $p < 0,0001$), entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,65$, $p < 0,0001$)(Figura 16C, Tabela 20). Ainda, observou-se uma forte diferença de distribuição da taxa de proliferação celular (ki67) entre tumores benignos e tumores malignos ($r = 0,54$, $p = 0,0002$) e entre tumores benignos e tumores vasculoinvasivos/metastáticos ($r = 0,55$, $p = 0,0004$)(Figura 16D, Tabela 20). As demais comparações não demonstraram significância estatística.

Em análise de correlação entre as variáveis associadas à transição epitélio-mesenquimal e atividade proliferativa, foi observada uma forte correlação negativa entre a expressão de vimentina em células de reserva e expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas ($\rho = -0,65$. $p < 0,0001$. Figura 17A), e uma forte correlação positiva entre a contagem de mitoses e a taxa de proliferação celular (ki67) ($\rho = 0,74$. $p < 0,0001$. Figura 17B). Houve correlação positiva moderada entre a expressão de vimentina em células diferenciadas e expressão de vimentina em células de reserva ($\rho = 0,56$. $p < 0,0001$ Figura 17C), expressão de vimentina em células de reserva e escore de morfologia fusiforme ($\rho = 0,42$. $p = 0,0002$. Figura 17D), expressão de vimentina em células de reserva e contagem de mitoses ($\rho = 0,4$. $p = 0,0004$. Figura 17E), expressão de vimentina em células diferenciadas e contagem de mitoses ($\rho = 0,41$. $p = 0,0003$), expressão de vimentina em células diferenciadas e Ki67 ($\rho = 0,42$. $p = 0,0005$. Figura 17F), expressão de E-caderina em células de reserva e em células diferenciadas ($\rho = 0,48$. $p < 0,0001$. Figura 17G) e contagem de mitoses e escore de morfologia fusiforme ($\rho = 0,44$. $p < 0,0001$. Figura 17H). Foi observada moderada correlação negativa entre expressão de vimentina e pancitoqueratina em células diferenciadas ($\rho = -0,51$. $p < 0,0001$. Figura 17I) e entre contagem de mitoses e expressão de E-caderina em células de reserva ($\rho = -0,42$. $p = 0,0004$. Figura 17J). Nas demais comparações, foram observadas correlações fracas ou ausência de correlação entre as variáveis. A tabela 21 demonstra os valores de ρ obtidos em análise de correlação das diversas variáveis avaliadas associadas a transição epitélio-mesenquimal.

Figura 16: Box-plots: Contagem de células com expressão de E-caderina citoplasmática, escores de morfologia fusiforme, contagem de mitoses e taxa de proliferação (Ki-67)

Fonte: WASQUES, 2018

NORM: Glândulas normais. BEN: Tumores benignos (adenomas e hiperplasias nodulares). MAL: Tumores malignos (carcinomas e epitelomas) sem invasão vascular ou metástase. INV/MET: Tumores malignos (carcinomas) com invasão vascular e/ou metástase. Os valores de contagem de células com expressão de E-caderina citoplasmática e contagem de mitoses foram transformados em $\log_{10}$ para melhor visualização dos gráficos. Os valores de p correspondem a testes de Wilcoxon-Mann Whitney com correção de Bonferroni. Apenas comparações estatisticamente significativas foram mostradas nos gráficos.

Tabela 20: Comparações entre os diferentes grupos diagnósticos, expressão de marcadores imuno-histoquímicos, morfologia fusiforme e atividade proliferativa - São Paulo - 2018

	FUSI			ECDCITO			MIT			KI67		
	<i>p</i> 0,0003 ^{kw}	<i>r</i>	<i>p</i> 0,0006 ^{kw}	<i>r</i>	<i>p</i> <0,0001 ^{kw}	<i>r</i>	<i>p</i> <0,0001 ^{kw}	<i>r</i>	<i>p</i> 0,0001 ^{kw}	<i>r</i>	<i>p</i> 0,0001 ^{kw}	<i>r</i>
NORM vs. BEN	NA	NA	0,5474	0,14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NORM vs. MAL	NA	NA	0,0001	0,46	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NORM vs. INV/MET	NA	NA	0,5625	0,15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BEN vs. MAL	0,0006	0,46	0,0863	0,31	<0,0001	0,77	0,0002	0,54	0,0004	0,55	0,0004	0,55
BEN vs. INV/MET	0,0005	0,51	1,0000	0,02	<0,0001	0,65	0,0001	0,65	0,0004	0,55	0,0004	0,55
MAL vs. INV/MET	1,0000	0,01	1,0000	0,28	0,8259	0,09	1,0000	0,13	1,0000	0,13	1,0000	0,13

Fonte: WASQUES, 2018

NORM: Glândulas normais. BEN: Tumores benignos (adenomas e hiperplasias nodulares). MAL: Tumores malignos (carcinomas e epitelomas), sem invasão vascular ou metástase. INV/MET: Tumores malignos (carcinomas) com invasão vascular e/ou metástase. FUSI: Escore de morfologia fusiforme. ECDCITO: Contagem de células com marcação citoplasmática de E-caderina. MIT: Contagem de mitoses. KI67: taxa de proliferação celular por KI67. Os valores de *p* correspondem a testes de Wilcoxon-Mann Whitney com correção de Bonferroni, exceto aqueles identificados com ^{kw}, que correspondem aos valores *p* de testes de Kruskal Wallis. O valor *r* corresponde ao tamanho de efeito ($r \geq 0,5$: efeito grande. $r \geq 0,3$: efeito médio. $r \geq 0,1$: pequeno efeito). NA: resultado não disponível.

Figura 17: Scatter-plots: Variáveis demonstrando correlações fortes ou moderadas

Fonte: WASQUES, 2018

NORM: Glândulas normais. BEN: Tumores benignos (adenomas e hiperplasias nodulares). MAL: Tumores malignos (carcinomas e epitelomas), sem invasão vascular ou metástase. INV/MET: Tumores malignos com invasão vascular e/ou metástase. Os valores de p correspondem ao teste de Spearman, e os valores de ρ correspondem à força da correlação. Foi acrescentado um ruído aleatório para pontos de mesmos valores para melhor visualização dos gráficos.

Tabela 21: Matriz de correlações entre escores de marcadores morfológicos e imuno-histoquímicos de transição epitélio-mesenquimal e atividade proliferativa - São Paulo - 2018

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Escore vimentina (células de reserva)	-								
2	Escore vimentina (células diferenciadas)	0,56****	-							
3	Escore pancitoqueratina (células de reserva)	-0,2	0,04	-						
4	Escore pancitoqueratina (células diferenciadas)	-0,65****	-0,51****	0,39**	-					
5	Escore E-caderina (células de reserva)	-0,35**	-0,18	0,14	-					
6	Escore E-caderina (células diferenciadas)	-0,2	-0,34**	0,07	0,31*	0,48****	-			
7	Escore de morfologia fusiforme	0,42***	0,29*	-0,14	-0,29*	-0,24*	-0,26*	-		
8	Expressão citoplasmática de E-caderina	0,13	0,03	-0,03	-0,12	-0,21	0	-0,05	-	
9	Contagem de mitoses	0,4****	0,41****	-0,11	-0,34**	-0,42****	-0,39**	0,44****	0,21	-
10	ki67	0,32**	0,42****	-0,05	-0,38**	-0,16	-0,12	0,29*	0,28*	0,74****

Fonte: WASQUES, 2018

Os valores apresentados correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman (ρ). $|\rho|$ 0 a 0,19: correlação muito fraca. $|\rho|$ 0,20 a 0,39: correlação fraca. $|\rho|$ 0,40 a 0,59: correlação moderada. $|\rho|$ 0,60 a 0,79: correlação forte. $|\rho|$ 0,80 a 1: correlação muito forte. Os asteriscos denotam correlações estatisticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Ao comparar as taxas de proliferação Ki67 entre os diagnósticos, considerando os diferentes graus de concordância entre os patologistas, foi observada uma diferença de distribuição entre os grupos (teste de Kruskal Wallis, $p=0,003$), com análise *post hoc* subsequente demonstrando uma diferença forte de distribuição da taxa de proliferação entre casos com 100% de concordância em neoplasia benigna e 100% de concordância com neoplasia maligna ($r=0,63$, $p=0,0021$), e entre casos com 100% de concordância em tumores benignos e 80% de concordância em tumor maligno ($r=0,53$, $p=0,0255$)(Figura 18 e Tabela 22). Em análise de curva ROC para definição de ponto de corte, considerando o diagnóstico de diferentes patologistas como desfecho, foi obtido um valor de Ki67 que variou de 6,5 a 7. Os valores de sensibilidade para o diagnóstico de malignidade variaram de 85,7 a 100%, enquanto que, para a especificidade, foram obtidos valores que variaram de 56,7 a 66,7. A área sob curva ROC variou de 0,764 a 0,861 (Tabela 23 e Figura 19).

Figura 18: Box-plot: Taxa de proliferação (Ki67) por grau de concordância diagnóstica

Fonte: WASQUES, 2018

100benigno, 80benigno, 60benigno: concordância de 100%, 80% e 60% dos patologistas quanto ao diagnóstico de tumor benigno (adenoma ou hiperplasia), respectivamente. 100maligno, 80maligno, 60maligno: concordância de 100%, 80% e 60% dos patologistas quanto ao diagnóstico de tumor maligno (epitelioma ou carcinoma), respectivamente. Os valores de p correspondem ao teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni. O valor r corresponde ao tamanho de efeito ($r \geq 0,5$: efeito grande. $r \geq 0,3$: efeito médio. $r \geq 0,1$: pequeno efeito).

Tabela 22: Valores de Taxa de proliferação (Ki67) por grau de concordância diagnóstica - São Paulo - 2018

Ki67(%)	Média(σ)	Mediana (intervalo interquartil)
100maligno	18,7 $\pm$ 7	19,4 (13,4 - 24,3)
80maligno	16,8 $\pm$ 13,4	10,8 (9,3 - 17,9)
60maligno	12,8 $\pm$ 8,8	12,4 (6,5 - 19,1)
60benigno	3,6 $\pm$ NA	3,6 (3,6 - 3,6)
80benigno	9,2 $\pm$ 4,4	9,9 (6,5 - 12,6)
100benigno	6,7 $\pm$ 6,3	5,5(3,1 - 7,7)

Fonte: WASQUES, 2018

100benigno, 80benigno, 60benigno: concordância de 100%, 80% e 60% dos patologistas quanto ao diagnóstico de tumor benigno (adenoma ou hiperplasia), respectivamente. 100maligno, 80maligno, 60maligno: concordância de 100%, 80% e 60% dos patologistas quanto ao diagnóstico de tumor maligno (epitelioma ou carcinoma), respectivamente. σ : desvio padrão. NA: valor não disponível.

Tabela 23: Pontos de corte de taxa de proliferação (Ki67) para o diagnóstico de malignidade de acordo com o patologista - São Paulo - 2018

Patologista	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	AUC
P1	6,5	87,5	66,7	0,812
P2	6,5	100	63,3	0,861
P3	7	93,3	57,6	0,804
P4	6,5	88,9	56,7	0,722
P7	6,5	85,7	59,3	0,764

Fonte: WASQUES, 2018

Pontos de corte, sensibilidades, especificidades e AUC para o diagnóstico de tumor maligno (são classificados como tumores malignos casos com taxa de proliferação Ki67 maior que os pontos de corte). A aferição de taxa de proliferação Ki67 foi realizada por apenas um patologista (P1), com contagem auxiliada por computador (software QuPath). Para obtenção de pontos de corte, sensibilidades, especificidades e AUC foram utilizados os diagnósticos obtidos por diferentes patologistas como desfechos. AUC: área sob curva ROC.

Figura 19: Curva ROC: Sensibilidade e especificidade da taxa de proliferação (Ki67) para o diagnóstico de malignidade, de acordo com o patologista

Fonte: WASQUES, 2018

A aferição de taxa de proliferação Ki67 foi realizada por apenas um patologista (P1), com contagem auxiliada por computador (software QuPath). Estão traçadas as curvas ROC considerando o diagnóstico de diferentes patologistas como desfechos.

5.4 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA

Do total de 62 pacientes incluídos no estudo, foi possível a obtenção de dados de seguimento em 33 (53,3%) casos. Para o restante dos casos não foi possível recuperação das informações pelo não retorno dos questionários enviados aos clínicos veterinários, perda de contato com o tutor do paciente, não disponibilidade de contato do clínico solicitante, ou por perda de dados de prontuário do paciente (Tabela 24). O período médio de seguimento foi de 547,36 dias ($\pm 227,44$). A Tabela 25 detalha os dados clínicos dos pacientes em estudo, os quais foram estratificados de acordo com classificação diagnóstica.

Dentre os animais machos que eram castrados no momento da apresentação clínica, a idade média de castração foi de 8,69 ($\pm 2,49$) anos (mediana: 8 anos, amplitude: 5 a 12 anos). As duas fêmeas incluídas em seguimento eram castradas, sendo que uma delas foi castrada aos 2 anos de idade, e para a outra não foi possível precisar o momento de castração. Dentre os animais inteiros no momento de apresentação clínica (23 casos), além da ressecção tumoral, foi instituída a castração como tratamento em 17 (73,9%)

Tabela 24: Detalhamento do recebimento de informações de seguimento - São Paulo - 2018

	N	%
Questionário recebido	33	53,3%
Não houve retorno	18	29%
Perda de contato com o proprietário	8	12,9%
Contato do clínico não disponível	2	3,2%
Perda de dados do paciente	1	1,6%
Total de casos	62	100%

Fonte: WASQUES, 2018

casos.

A ampliação das margens cirúrgicas foi relatada em 6 casos, com margens ampliadas livres de células neoplásicas em 4 casos, margens comprometidas em 1 caso, e desconhecida em 1 caso (histopatologia não realizada).

A apresentação como múltiplas lesões nodulares foi observada para 10 casos, 8 deles apresentando-se com 2 nódulos e 1 deles com 4 nódulos. Para um dos casos, foi relatada a presença de múltiplos nódulos perianais, porém não foi especificada a quantidade, nem foi realizada a análise histopatológica de todos os nódulos.

O exame citológico foi realizado previamente à ressecção tumoral em 7 casos, com concordância cito-histológica para 3 casos, discordância para outros 3 casos (maligno em citologia e benigno em histopatologia), e concordância parcial para 1 caso (concordante quanto à origem celular; malignidade não determinada). Em 2 dos casos discordantes foi relatada influência de resultado citopatológico na conduta clínica: em um dos casos, o diagnóstico citológico de malignidade foi decisivo para a opção de ressecção tumoral e não somente pela castração; e em um dos casos, com lesão localizada em cauda, o resultado citopatológico foi decisivo para a decisão de amputação de cauda. Em nenhum dos casos foi descrita a realização de biópsia incisional previamente à ressecção.

O tratamento quimioterápico foi instituído em 2 casos, sendo um dos casos com uso de vincristina, doxorrubicina e ciclofosfamida, e manutenção com ciclofosfamida em dose metronômica, e em outro caso com uso de carboplatina.

Para 4 casos, havia histórico de diagnóstico prévio de tumor hepatoide (diagnosticado por exame histopatológico), em um período que variou de 123 a 983 dias previamente ao diagnóstico do momento de inclusão neste estudo (para um destes casos houve diagnóstico prévio de tumor hepatoide em dois momentos). Dois destes nódulos prévios tiveram o diagnóstico de carcinoma, um deles teve o diagnóstico de adenoma e, para outros 2, não havia informações quanto à malignidade.

O acompanhamento do paciente por parte do clínico se deu por meio de contato

telefônico com o proprietário em 6 casos, por meio de atendimento clínico em 23 casos e por meio de exames complementares em 10 casos (ex.: ultrassom abdominal, raio-x de tórax, ecoardiograma, hemogramas e/ou exames bioquímicos). A periodicidade relatada de monitoramento do paciente foi variável, variando de monitoramento quinzenal ou semestral, havendo em alguns casos um monitoramento mais frequente (semanal ou mensal) no período de curto prazo subsequente à ressecção tumoral. Em alguns casos não houve aderência por parte dos tutores aos períodos de monitoramento recomendados pelos clínicos veterinários.

As recorrências locais foram observadas em 5 casos (1 adenoma, 2 carcinomas sem invasão vascular e 2 carcinomas vasculoinvasivos), em um período que variou de 107 a 542 dias após o diagnóstico. Para 2 casos houve uma segunda recorrência local de lesão tumoral, 164 e 664 dias após a primeira recorrência, e para um destes casos foi relatada uma terceira recorrência tumoral, 151 dias após o diagnóstico da segunda recorrência. Metástases foram relatadas em 5 casos no período de seguimento e diagnosticadas por exames de imagem (ultrassom e raio-x), em um período que variou de 159 a 490 dias após o diagnóstico original. Os órgãos alvos relatados das metástase foram intestino, linfonodos abdominais e baço (1 caso), pulmão (1 caso), cavidade abdominal (1 caso), linfonodo hipogástrico (1 caso), e baço (1 caso). Do total de casos em seguimento, 15 (45,4%) vieram a óbito, mas apenas 6 deles (18,2%) foram interpretados como óbitos decorrente da doença, de acordo com os achados clínicos e exames complementares. Em nenhum caso foi realizada necropsia para confirmação de diagnóstico de doença metastática. A tabela 26 detalha os casos de óbito em estudo e as prováveis causas.

As tabelas 27 a 30 demonstram as variáveis preditivas de recorrência local, recorrência de doença, sobrevida global e sobrevida doença-específica em análise univariada. Houve tentativa de realização de análise multivariada, mas não foi possível obter convergência para estimativa de valor p para diversas variáveis, e optou-se por não relatar esta análise. A figura 20 demonstra as curvas de sobrevida para os diversos desfechos de acordo com a categoria diagnóstica, e as figuras 21 a 24 demonstram as curvas de sobrevida de acordo com as diversas variáveis preditivas. As tabelas 31 a 34 detalham as variáveis preditivas, com seus respectivos pontos de corte obtidos em análise de curva ROC, estimativas de sobrevida em 1 ano, sobrevida mediana e área sob curva ROC.

Tabela 25: Detalhamento de dados clínicos dos pacientes em seguimento - São Paulo - 2018

	Tumores benignos	Tumores malignos	Tumores malignos vasculoinvasivos/metastáticos
n	12	15	6
Raça (n)	SRD (4) Lhasa Apso (3) Cocker, Pastor Belga, Fox Terrier, Yorkshire, Golden retriever (1 cada)	SRD(4) Poodle (3) Cocker, Beagle (2 cada) Schnauzer, Labrador, Teckel, West (1 cada)	Poodle (2) Staffordshire, Akita, Labrador, SRD (1 cada)
Localização (n)	Anal/perianal (10) Cauda (1) Perianal e cauda (1)	Anal/perianal (12) Cauda (2) Perianal e cauda (1)	Perianal (2) Perianal e face (1) Linfonodo inguinal esquerdo (1) Linfonodos inguinais (1) Região inguinal direita (1)
Idade (anos)	10,83±3,27	13,67±1,99	11,5±2,35
Relação macho:fêmea	11:1	15:1	6:0
Inteiro	8 (66,6%)	11 (68,7%)	4/6 (66,6%)
Tamanho (cm)	1,94±0,82	1,87±0,65	3,72±1,24
Múltiplos nódulos	2 (16,6%)	5 (33,3%)	3 (50%)
Tumor recorrente	0	2 (13,3%)	2 (40%)
Margens			
Livres	5 (41,6%)	4 (26,6%)	0
Estreitas	3 (25%)	5 (33,3%)	2 (33,3%)
Comprometidas	4 (33,4%)	6 (40,1%)	4 (66,4%)
Tempo de seguimento	645,33 (±183,64)	596,27 (±152,17)	229,17 (±200,79)
Óbito	719,25 (±80,37)	475,17 (±132,51)	263,6 (±203,72)
Não óbito	608,38 (±213,41)	677 (±105,91)	57 (NA)

Fonte: WASQUES, 2018

Para animais com múltiplos nódulos, foi considerado a lesão tumoral de maior tamanho para contabilização de tamanho tumoral. Os dados de tamanho tumoral e idade estão expressos em média $\pm \sigma$ (desvio padrão).

Tabela 26: Detalhamento dos casos de óbito em seguimento - São Paulo - 2018

No. Caso	Diagnóstico original	Óbito específico	Eutanasiado	Causa provável atribuída ao óbito
136753	Adenoma	N	N	Provável associação com quadro epiléptico
138251	Adenoma	N	S	Alteração vestibular/neurológica
138621	Adenoma	N	N	Cardiopatia
138796	Adenoma	N	N	Hiperadrenocorticismismo iatrogênico e pancreatite
139177	Adenoma	N	S	Hiperlipidemia, hepatopatia e diabetes, e suspeita de hiperadrenocorticismismo
139530	Carcinoma	N	NI	Angústia respiratória (provável doença metastática). Diagnóstico prévio de carcinoma de vesícula urinária
139558	Carcinoma	N	N	Insuficiência Cardíaca
139632	Carcinoma	N	N	Cardiopatia
160448	Carcinoma metastático	N	S	Metástases pulmonares. Diagnóstico prévio de neoplasia cutânea anaplásica/indiferenciada
137548	Carcinoma	S	S	Metástases em intestino, linfonodos abdominais e baço
137706	Carcinoma	S	N	Metástase pulmonar
139586	Carcinoma	S	S	Metástase em cavidade abdominal (aderidas a pâncreas e rim)
76330	Carcinoma	S	S	Metástase em linfonodos abdominais
125504	Carcinoma metastático	S	N	Metástase em linfonodos e baço
159024	Carcinoma metastático	S	S	Metástases em linfonodos hipogástricos e inguinais. Edema de membros, infecção urinária

Fonte: WASQUES, 2018

O óbito foi considerado específico em caso de morte natural ou eutanásia decorrentes de progressão/metástase da doença, e quando a metástase não pudesse ser atribuída a outros processos neoplásicos concomitantes. Os casos 160448 e 139530 não foram considerados como óbito específicos pela presença concomitante de lesões neoplásicas com potencial considerável de metástase. N: Não; S: Sim. NI: Não informado.

Figura 20: Curvas de Kaplan-Meier estratificadas por classe diagnóstica

Fonte: WASQUES, 2018

Traços verticais correspondem a casos censurados à direita (seja por perda de seguimento ou por ocorrência de evento não relacionado ao desfecho referente). Os valores de p são referentes aos testes de *log-rank*.

Tabela 27: Variáveis preditivas de intervalo livre de recorrência local - São Paulo - 2018

Variáveis (categorias)	HR (IC95)	p
Análise univariada		
Escore de E-caderina em células diferenciadas (22)	0,80 (0,69-0,91)	0,0019
Escore de morfologia fusiforme (11)	2,21 (1,30-4,25)	0,0044
Perda de polaridade (12)	1,48 (1,11-2,36)	0,0046
Grau de infiltração (4)	2,35 (1,22-4,77)	0,0125
Quimioterapia (2)	43,50 (2,32-6347,53)	0,0140
Animal castrado após diagnóstico (2)	0,12 (0,02-0,65)	0,0147
Margens (3)	6,53 (1,26-679,75)	0,0185
Classe diagnóstica (3)	4,27 (1,09-18,12)	0,0370

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%

Tabela 28: Variáveis preditivas de intervalo livre de doença - São Paulo - 2018

Variáveis (categorias)	HR (IC95)	<i>p</i>
Análise univariada		
Classe diagnóstica (3)	7,30 (2,44-24,27)	0,0003
Quimioterapia (2)	109,55 (8,45-15333,19)	0,0004
Escore de E-caderina em células diferenciadas (22)	0,81 (0,72-0,91)	0,0008
Perda de polaridade (12)	1,30 (1,07-1,63)	0,0061
Grau de infiltração (4)	2,00 (1,19-3,32)	0,0103
Doença recorrente (2)	7,63 (1,70-30,16)	0,0106
Escore de E-caderina em células de reserva (22)	0,86 (0,71-0,97)	0,0125
Escore de morfologia fusiforme (11)	1,71 (1,10-2,62)	0,0191
Proporção de células de reserva (4)	1,65 (1,04-2,59)	0,0362

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%

Tabela 29: Variáveis preditivas de sobrevida global - São Paulo - 2018

Variáveis (categorias)	HR (IC95)	<i>p</i>
Análise univariada		
Classe diagnóstica (3)	4,96 (2,00-13,26)	0,0005
Quimioterapia (2)	31,22 (4,04-349,39)	0,0019
Tamanho tumoral (contínua)	2,53 (1,36-4,88)	0,0038
Diferenciação sebácea (3)	2,71 (1,32-5,93)	0,0062
Proporção de células de reserva (4)	1,61 (1,10-2,34)	0,0170
Perda de polaridade (12)	1,17 (1,02-1,36)	0,0240
Escore de E-caderina em células de reserva (22)	0,91 (0,82-1,00)	0,0412

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%

Tabela 30: Variáveis preditivas de sobrevida doença-específica - São Paulo - 2018

Variáveis (categorias)	HR (IC95)	<i>p</i>
Análise univariada		
Classe diagnóstica (3)	15,72 (3,86-89,18)	0,0001
Quimioterapia (2)	106,95 (8,29-14949,70)	0,0004
Escore de E-caderina em células de reserva (22)	0,80 (0,53-0,97)	0,0178
Tamanho tumoral (contínua)	2,78 (1,13-7,15)	0,0267
Escore de E-caderina em células diferenciadas (22)	0,85 (0,74-0,99)	0,0364

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%

Tabela 31: Variáveis associadas a recorrência local: pontos de corte, % sobrevida livre de recorrência local em 1 ano, sobrevida mediana livre de recorrência local, e área sob curva ROC - São Paulo - 2018

	Ponto de corte	% livre de recorrência local em 1 ano (IC95)	Mediana (d)(IC95)	Área sob curva ROC
Escore de E-caderina em células diferenciadas	≥ 19 < 19	95,2 (86,6-100) 68,6 (40,3-100)	NA 437 (183-NA)	0,904 -
Escore de morfologia fusiforme	≥ 1 < 1	84,4 (69,7-100) 100 (100-100)	NA (542-NA) NA	0,831 -
Perda de polaridade	≥ 7 < 7	75,5 (54,9-100) 100 (100-100)	NA (437-NA) NA	0,957 -
Grau de infiltração	≥ 3 < 3	66,7 (37,9-100) 95,8 (88,2-100)	437 (183-NA) NA	0,793 -
Quimioterapia	1 0	NA 93,1 (84,3-100)	107 (107-NA) NA	0,580 -
Castrado após diagnóstico	1 0	92,1 (82,3-100) 80 (51,6-100)	NA 542 (437-NA)	0,788 -
Margens	≥ 2 < 2	77,4 (57,8-100) 100 (100-100)	NA (437-NA) NA	0,843 -
Diagnóstico	3 2 1	37,5 (8,4-100) 93,3 (81,5-100) 100 (100-100)	182 (107-NA) NA NA	0,741 - -

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%. NA: Valores não disponíveis.

Figura 21: Curvas de Kaplan-Meier de variáveis associadas à recorrência local

(E) Sobrevida livre de recorrência local

(F) Sobrevida livre de recorrência local

(G) Sobrevida livre de recorrência local

Fonte: WASQUES, 2018

Traços verticais correspondem a casos censurados à direita (por perda de seguimento ou por ocorrência de evento não relacionado à recorrência local). Os valores de p são referentes aos testes de *log-rank*.

Tabela 32: Variáveis associadas a recorrência: pontos de corte, % sobrevida livre de recorrência em 1 ano, sobrevida mediana livre de recorrência, e área sob curva ROC - São Paulo - 2018

	Ponto de corte	% livre de recorrência em 1 ano (IC95)	Mediana (d)(IC95)	Área sob curva ROC
Escore de E-caderina em células diferenciadas	≥19 < 19	95,2 (86,6-100) 42,9 (18,2-100)	NA 343 (147-NA)	0,913 -
Escore de E-caderina em células de reserva	≥13 < 13	100 (100-100) 70,1 (51,2-96)	NA NA (437-NA)	0,804 -
Escore de morfologia fusiforme	≥1 < 1	74,3 (57,1-96,6) 100 (100-100)	NA (437-NA) NA	0,728 -
Perda de polaridade	≥10 < 10	Intensa (predominante) Discreta/moderada (predominante/parcial)	437 (147-NA) NA	0,850 -
Proporção de células de reserva	≥2 < 2	≥25% <25%	464 (182-NA) NA	0,703 -
Grau de infiltração	≥2 < 2	Presente (raros focos/parcial/predominante) Ausente	490 (183-NA) NA	0,778 -
Doença recorrente	1 0	Sim Não	336 (147-NA) NA	0,682 -
Quimioterapia	1 0	Sim Não	127 (107-NA) NA	0,596 -
Diagnóstico	3 2 1	Vasculoinvasivo/metastático Maligno não vasculoinvasivo Benigno	164 (107-NA) NA (478-NA) NA	0,829 - -

Fonte: WASQUES, 2018
IC95: Intervalo de confiança de 95%. NA: Valores não disponíveis.

Figura 22: Curvas de Kaplan-Meier de variáveis associadas ao intervalo livre de doença

(E) Sobrevida livre de recorrência de doença

(F) Sobrevida livre de recorrência de doença

(G) Sobrevida livre de recorrência de doença

(G) Sobrevida livre de recorrência de doença

Fonte: WASQUES, 2018

Traços verticais correspondem a casos censurados à direita (por perda de seguimento ou por ocorrência de evento não relacionado à recorrência de doença). Os valores de p são referentes aos testes de *log-rank*.

Tabela 33: Variáveis associadas a sobrevida global: pontos de corte, % sobrevida global em 1 ano, sobrevida mediana global, e área sob curva ROC - São Paulo - 2018

	Ponto de corte	% sobrevida global em 1 ano (IC95)	Mediana (d)(IC95)	Área sob curva ROC
Escore de E-caderina em células de reserva	≥ 13	-	755 (747-NA)	0,538
	≥ 13	-	673 (345-NA)	-
Perda de polaridade	≥ 10	Intensa (predominante)	429 (258-NA)	0,534
	≥ 10	Discreta/moderada (predominante/parcial)	755 (747-NA)	-
Proporção de células de reserva	≥ 2	≥ 25%	429 (323-NA)	0,538
	< 2	<25%	775 (747-NA)	-
Diferenciação sebácea	≥ 2	Presente	600 (478-NA)	0,576
	< 2	Ausente	775 (755-NA)	-
Tamanho tumoral	≥ 2,4cm	-	584 (323-NA)	0,721
	< 2,4cm	-	NA (747-NA)	-
Quimioterapia	1	Sim	202 (147-NA)	0,542
	0	Não	755 (673-NA)	-
Diagnóstico	3	Vasculoinvasivo/metastático	258 (147-NA)	0,539
	2	Maligno não vasculoinvasivo	NA (584-NA)	-
	1	Benigno	775 (747-NA)	-

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%. NA: Valores não disponíveis.

Figura 23: Curvas de Kaplan-Meier de variáveis associadas à sobrevida global

Fonte: WASQUES, 2018

Traços verticais correspondem a casos censurados à direita (por perda de seguimento). Os valores de p são referentes aos testes de *log-rank*.

Tabela 34: Variáveis associadas a sobrevida doença-específica: pontos de corte, % sobrevida doença-específica em 1 ano, sobrevida mediana doença-específica, e área sob curva ROC - São Paulo - 2018

	Ponto de corte	% sobrevida doença-específica em 1 ano (IC95)	Mediana (d)(IC95)	Área sob curva ROC
Escore de E-caderina em células de reserva	≥ 3	95,7 (87,7-100)	NA	0,899
	< 3	25 (4,6-100)	302 (147-NA)	-
Escore de E-caderina em células diferenciadas	≥ 19	95 (85,9-100)	NA	0,793
	< 19	57,1 (30,1-100)	NA (258-NA)	-
Tamanho tumoral	≥ 2,4cm	70 (46,7-100)	NA (323-NA)	0,705
	≥ 2,4cm	94,7 (85,2-100)	NA	-
Quimioterapia	1	NA	202 (147-NA)	0,647
	0	92,7 (83,5-100)	NA	-
Diagnóstico	3	25 (4,6-100)	290 (147-NA)	0,930
	2	92,9 (80,3-100)	NA	-
	1	100 (100-100)	NA	-

Fonte: WASQUES, 2018

IC95: Intervalo de confiança de 95%. NA: Valores não disponíveis.

Figura 24: Curvas de Kaplan-Meier de variáveis associadas à sobrevida doença-específica

Fonte: WASQUES, 2018

Traços verticais correspondem a casos censurados à direita (seja por perda de seguimento ou por óbito não associado à doença). Os valores de p são referentes aos testes de *log-rank*.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo pretendeu analisar o grau de discordância diagnóstica entre patologistas para os tumores de glândula hepatoide em cães, bem como determinar a participação do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal e o impacto de diversos critérios clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos em desfechos prognósticos. Os principais achados e limitações decorrentes deste estudo serão discutidos a seguir.

Com relação à distribuição de raças observada no presente estudo, com exceção dos animais sem raça definida (SRD), os mais frequentemente acometidos por tumores hepatoides foram os poodles, labradores, lhasa apsos e shih tzus. Goldschmidt e Shofer (1992) relataram uma maior chance de desenvolvimento de adenomas em lhasa apsos e shih tzus. Os poodles tem sido elencados em outros estudos, com evidências indicando se tratar de uma raça com menor risco de desenvolvimento da neoplasia (HAYES; WILSON, 1977; SILVA; PELETEIRO; CORREIA, 2002). Embora no presente estudo não tenha sido possível comparar com uma população de referência, alguns achados podem ser destacados. Dentre os 7 cães da raça labrador, 4 apresentaram carcinomas com evidências histológicas de invasão vascular ou metástase (vasculoinvasivos/metastáticos), e o mesmo ocorreu para 4/9 cães da raça poodle. Estes achados sugerem a possibilidade destas raças serem mais predispostas às variantes mais agressivas deste tumor. Embora Hayes e Wilson (1977) tenham demonstrado um menor risco de desenvolvimento da neoplasia para os poodles, não foram comparadas as proporções de malignidade/doença metastática dentre os animais de mesma raça. Para os labradores, não foram encontrados relatos sobre sua predisposição ao desenvolvimento de neoplasias hepatoides malignas. Estudos adicionais com uma maior amostragem destas raças são sugeridos para melhor avaliação desta hipótese.

A faixa etária observada no presente estudo, com média de 11,17 anos, sem aparente diferença entre os grupos diagnósticos, é consistente com os dados já relatados por outros autores (BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). De maneira semelhante a outros estudos, a maioria dos casos ocorreram em cães machos inteiros, com apenas 9/31 (29%) machos castrados demonstrando a neoplasia. (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; HAYES; WILSON, 1977). Embora esta proporção de cães machos castrados seja mais elevada que as citadas por Nielson e Aftosmis (1964) e Hayes e Wilson (1977), com menos de 1% de animais castrados dentre os machos, e por Goldschmidt e Shofer (1992), com 16,9%, ressalta-se que todos os animais do presente estudo foram castrados com idade igual ou maior que 5 anos. De maneira semelhante,

Vail et al. (1990) descreveram alguns casos de carcinoma em machos castrados, com 7 de 9 casos castrados com idade superior a 5 anos. Estes achados sugerem que a castração em idade mais jovem pode ser mais eficaz para a prevenção da ocorrência de tumores hepatoides, e que a participação de estímulos hormonais possam ter maior importância na iniciação tumoral, com a progressão tumoral ocorrendo em maior ou menor grau independentemente do estímulo androgênico. Algumas evidências sugerem que um efeito semelhante ocorre em neoplasias mamárias em cadelas (outra neoplasia considerada hormônio-dependente), nas quais a castração anterior aos 2,5 anos de idade pode estar associada a uma redução considerável do risco de desenvolvimento de tumores malignos, com uma redução ainda maior quando da castração anterior ao primeiro ciclo estral (BEAUVAIS; CARDWELL; BRODBELT, 2012).

A localização mais frequentemente acometida por tumores hepatoides foi a região anal/perianal, seguida da cauda, e com menos casos em região parapiânica, de maneira semelhante ao descrito em outros estudos (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992; SILVA; PELETEIRO; CORREIA, 2002; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Alguns poucos casos foram observados em localizações menos usuais, como em região lombar e tecido cutâneo de face (este com metástase em linfonodo submandibular). A presença de tumores hepatoides em região lombar ou dorso é raramente descrita em alguns levantamentos (NIELSON; AFTOSMIS, 1964; SILVA; PELETEIRO; CORREIA, 2002). Alguns relatos tem descrito a ocorrência de tumores hepatoides em localizações ainda menos usuais, como primários de cavidade abdominal ou região intrapélvica, e tem sido interpretados como tumores originários de tecido glandular hepatoide ectópico (ALEXANDER et al., 1976; JARDIM et al., 2018). Nestes casos observados no presente estudo, é possível que estes tumores tenham se originado de tecido hepatoide ectópico, embora a possibilidade de se tratar de uma neoplasia de anexos cutâneos com diferenciação hepatoide não possa ser completamente descartada (ex.: carcinoma sebáceo com diferenciação hepatoide). O fenômeno de diferenciação hepatoide em tumores sebáceos tem sido descrito em literatura (GROSS et al., 2005), mas as lesões deste estudo não foram interpretadas como tal devido ao predomínio de células com diferenciação hepatoide.

O tamanho das lesões tumorais não apresentou diferença aparente na comparação entre tumores benignos com os tumores malignos (não vasculoinvasivos e não metastáticos), com valores médios de 1,82 cm e 1,9 cm, respectivamente. Estes achados vão ao encontro do descrito por Berrocal et al. (1989), que tampouco demonstraram diferença aparente de tamanho entre os tumores bem diferenciados e os moderadamente/pouco diferenciados, embora tenham relatado valores médios

ligeiramente maiores (2,4cm e 2,1cm, respectivamente). Esta pequena diferença pode ser, em parte, atribuída ao método de aferição utilizado no presente estudo. Como não havia informações disponíveis acerca do tamanho tumoral no momento da apresentação clínica para a maioria dos casos, optou-se por utilizar as informações de registro anatomopatológico, considerando a análise de exame macroscópico das peças em formalina. Assim, é provável que estes valores estejam subestimados, já que amostras excisadas demonstram uma redução significativa de tamanho, podendo atingir até por volta de 40% de redução no comprimento de peça cirúrgica (KERN et al., 2008; DAUENDORFFER et al., 2009). A semelhança do tamanho tumoral entre as neoplasias benignas e malignas sugere que, ao menos para a maioria dos casos, não parece haver um aumento de tamanho associado à progressão tumoral. Em contrapartida, para os tumores vasculoinvasivos/metastáticos, foi observado um tamanho tumoral maior (média de 3,48cm), indicando que para as neoplasias malignas, um maior tamanho tumoral pode estar associado a um comportamento biológico mais agressivo nas neoplasias malignas.

Embora apenas poucos casos tenham referido a realização de exame histopatológico dos testículos nos animais machos incluídos neste estudo, a ocorrência de tumores testiculares em 5 animais, mais a suspeita ultrassonográfica de neoplasia testicular em 2 casos adicionais, reforçam a relação já consistente em literatura entre a ocorrência de tumores de glândula hepatoide e tumores testiculares (LIPOWITZ et al., 1973; HAYES; WILSON, 1977; VAIL et al., 1990; ASSUNÇÃO, 2003). Exemplos dos 3 tumores testiculares mais comuns (tumor de células intersticiais, seminoma e tumor de células de Sertoli) foram observados, inclusive casos com múltiplas lesões nodulares, porém a baixa quantidade de casos impediu que fosse realizada uma análise estatística destes achados. A baixa prevalência de tumores testiculares relatada neste estudo (7 de 59 animais machos) reflete, mais provavelmente, uma dificuldade na recuperação de informações acerca do histórico clínico dos animais, já que para muitos casos não foi possível obter o retorno dos clínicos veterinários responsáveis. Ainda, é possível que para alguma parte dos animais castrados não tenha ocorrido a solicitação de exame histopatológico.

Na análise histopatológica dos tumores hepatoides pelos múltiplos observadores, não foi incomum a ocorrência de casos problemáticos para a classificação em neoplasia benigna ou maligna. Esta dificuldade é evidenciada pela alta proporção de casos em que não foi obtido consenso diagnóstico: em 14/57 (24,5%) casos houve discordância de diagnóstico por mais de um patologista, e para 35/57 (61,4%) casos houve discordância diagnóstica por parte de pelo menos um dos patologistas em estudo. Ganguly e Wolfe (2006) estudaram uma série de 44 tumores de glândula hepatoide, avaliados por 2 patologistas, e houve discordância diagnóstica em 8 casos (18,8%). Esta discrepância

de interpretação nestes casos foi atribuída à presença de áreas de pleomorfismo celular, com alto índice mitótico (1 a 4 mitoses por campo de maior aumento), apesar da preservação de arquitetura lobular típica dos adenomas (GANGULY; WOLFE, 2006). No presente estudo, estas discrepâncias podem também ter advindo da presença de achados morfológicos conflitantes, como lesão não infiltrativa com áreas de atipia celular, invasão tecidual equívoca, presença de mitoses atípicas em uma lesão sem demais atipias. A invasão estromal, tida por alguns autores como um dos critérios ouro para a caracterização de malignidade nos tumores hepatoides (GINN; MANSELL; RAKICH, 2007; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017), demonstrou, na análise interobservador, uma concordância ruim para a maioria dos pares de comparação ($ICC < 0,4$), com uma concordância razoável para apenas 3 dos 10 pares de comparação. Esta discordância pode advir da dificuldade de se distinguir uma invasão estromal real de tecido tumoral de um processo de pseudoinvasão, caracterizado pela presença de ilhas/ninhos de tecido tumoral benigno em meio ao estroma fibroso, mas que podem se assemelhar a um processo real de invasão. Em literatura médica, esta dificuldade tem sido enfatizada para algumas neoplasias em particular, como em casos de tumores ovarianos *borderline* com microinvasão, na distinção entre adenomas e adenocarcinomas colorretais, e carcinomas hepatocelulares (HANSEN; FENGER; KRONBORG, 1999; KIM et al., 2007; KONDO, 2011). Para os tumores hepatoides, não é incomum a ocorrência de reação inflamatória estromal ou áreas de necrose/infarto tumoral, e é possível que alguns processos interpretados como invasão possam representar de fato uma pseudoinvasão, associada a reorganização fibrosa do tecido necrótico/inflamado, com aprisionamento de células tumorais benignas resquiciais. Por se tratar de um evento essencial para a caracterização de malignidade, sugere-se que critérios rigorosos sejam elaborados para que uma concordância maior seja alcançada na definição do comportamento invasivo.

Com relação à reprodutibilidade da contagem de mitoses entre os patologistas, foi observada uma concordância média boa ($ICC = 0,60$), com 3 pares de comparação demonstrando concordância excelente ($ICC > 0,74$), e 4 pares demonstrando concordância razoável. Em literatura, graus variáveis de concordância entre patologistas tem sido relatados com relação à atividade mitótica para processos neoplásicos variados, com valores de κ (para estudos de classificação mitótica em grupos categóricos) variando de 0,65 a 0,89 (ROBBINS et al., 1995; KHAN et al., 2013; VETA et al., 2016) e de ICC variando de 0,38 a 0,76 (ZUCKMAN; WILLIAMS; LEVIN, 1988; FRANC et al., 2003; SCOLYER et al., 2003). Em literatura veterinária, Yap et al. (2017) investigaram a concordância do escore de mitoses em sarcomas de partes moles em cães, com concordância excelente entre os patologistas ($ICC = 0,78$). Estes graus variados de

concordância podem refletir em parte métodos estatísticos diferentes de comparação, mas também alguns fatores técnicos inerentes à avaliação histopatológica. Um dos fatores que podem contribuir para esta variação é a interpretação do patologista com relação a quais figuras são consideradas mitoses e quais são consideradas artefatos técnicos ou outros eventos nucleares (como picnose ou apoptose). Veta et al. (2016) investigaram a concordância de patologista quanto à contagem de mitoses ao nível do objeto, com coeficientes de similaridade de Dice variando de 0,57 a 0,67, indicando que os patologistas frequentemente não concordam com a classificação de uma figura mitótica no nível individual. As figuras mitóticas de baixa concordância tendem a ter um comprimento ligeiramente menor que aquelas de maior concordância, e este menor tamanho pode dificultar sua visualização em análise microscópica, contribuindo para uma menor concordância (VETA et al., 2016). Outros possíveis fatores que poderiam explicar estas discordâncias incluem o tempo de avaliação por lâmina, já que um maior tempo de análise permitiria maior chance de repetições de contagens e detecção de áreas com maior contagem de mitoses, e discordâncias quanto ao julgamento de quais regiões das lâminas são interpretadas como *hot-spots*.

Meuten, Moore e George (2016) tem alertado sobre a necessidade de padronização de método de contagem de mitoses em patologia veterinária, enfatizando a importância de se relatar a contagem por área, e não por campo, já que diferentes microscópicos possuem áreas de campo diferentes, podendo introduzir variações entre diferentes estudos e comprometer, em certa medida, a reprodutibilidade. No presente trabalho, alguns dos patologistas utilizaram microscópios com áreas de campo distintas entre eles e, devido a este fator, foi realizada uma conversão da contagem de mitoses por campo relatada por cada patologista para contagem por área ($2,37 \text{ mm}^2$), com o intuito de diminuir a variação interobservadores. Adicionalmente, os patologistas foram instruídos a relatar as contagens nas áreas mais mitoticamente ativas das neoplasias (*hot-spots*), evitando-se áreas próximas a úlceras. De maneira inesperada, ao comparar os valores de concordância calculados a partir dos valores originais (contagem de mitoses por campo de maior aumento) com aqueles obtidos a partir dos valores convertidos (por área), notou-se uma diminuição da concordância entre os patologistas. Este achado pode ser explicado pelo fato de que houve coincidência entre os patologistas que demonstraram um viés para maior contagem de mitoses e o uso de microscópios com menor área de campo, enquanto que os patologistas com tendência de atribuírem uma menor contagem de mitoses utilizaram microscópios com maior área de campo, de modo que as concordâncias calculadas sem a correção por área estão superestimadas. Este achado ressalta a importância de outros fatores que podem exercer influência na variação entre observadores

para este critério, como já discutido.

A presença de mitoses em células diferenciadas tem sido sugerida por alguns autores como um critério de malignidade para tumores hepatóides, sob a suposição de que estas células consistem de um componente celular estável não proliferativo em condições de normalidade, e sua atividade mitótica deve indicar um processo aberrante de replicação, indicativo de malignidade (GROSS et al., 2005; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). A utilidade deste critério foi testada com relação à concordância entre patologistas e, para a maioria dos pares de comparação, foi observada uma concordância ruim, com apenas 3 dos 10 pares demonstrando uma concordância razoável. Além das dificuldades inerentes da definição do que se deve considerar ou não como figura mitótica, como já discutido, um entrave adicional que pode explicar esta discrepância inclui algum grau de dificuldade em se distinguir uma célula diferenciada ou parcialmente diferenciada de uma célula de reserva. Esta dificuldade pode ser ainda maior em casos em que se observa uma maior perda de polaridade celular, já que há graus variáveis de desorganização da localização lobular periférica típica das células de reserva. Ainda, uma dificuldade adicional pode incluir o fato de que, em glândulas hepatóides, diferentemente das glândulas sebáceas, pode haver uma mistura de células de tamanho pequeno com células mais volumosas no componente periférico germinativo (SHABADASH; ZELIKINA, 2002), podendo estas serem variavelmente interpretadas ou não como células diferenciadas ou parcialmente diferenciadas.

Alguns autores tem destacado que áreas localizadas de atipia celular podem ser observadas em adenomas de glândula hepatoide, e alguns deles sugerem a caracterização destas lesões como carcinoma *in situ* (GROSS et al., 2005; GANGULY; WOLFE, 2006; SPUGNINI et al., 2007). Frente a estas constatações, este estudo se propôs a elaborar, dentre os diversos critérios de classificação morfológica, um sistema que pudesse considerar estas lesões mais localizadas. Neste sentido, foram estabelecidas diversas categorias para os critérios de atipia celular e perda de polaridade celular, considerando a distribuição e intensidade dos graus de atipia, embora uma classificação de carcinoma *in situ* não tenha sido incluída na análise. De fato, a presença destas áreas de atipia celular podem representar um fator de confusão no diagnóstico, introduzindo variações entre os patologistas. No presente estudo, foi observado um grau de concordância médio razoável para os critérios de atipia celular e perda de polaridade celular (ICC=0,4), mas com a maioria dos pares de comparação demonstrando concordância ruim (6 pares para cada critério), e com apenas 1 par de comparação demonstrando boa concordância para atipia celular (ICC=0,6), e concordância excelente para perda de polaridade (ICC=0,8). Estes achados ressaltam a subjetividade inerente à classificação de atipia tumoral, e reforçam

a necessidade de elaboração de métodos mais objetivos para a categorização da atipia celular. Como exemplo, pode-se citar os critérios de atipia celular propostos por Kiupel et al. (2011) nas graduações dos mastocitomas, nos quais consideram, de maneira mais objetiva, a contagem de células multinucleadas ou com núcleos de morfologia bizarra, além de proporção mínima de 10% de células com variação de diâmetro nuclear de pelo menos 2 vezes). Outro exemplo são os critérios de avaliação de atipia nuclear em carcinomas mamários felinos, propostos por Mills et al. (2015), que definiram como morfologia nuclear anormal a presença de ao menos 5% de células tumorais demonstrando qualquer desvio de contorno nuclear ovalado/arredondado.

No presente trabalho foi observada, com frequência, a presença de células hepatoides multinucleadas, tanto em tumores benignos quanto em tumores malignos, assim como em tecido glandular normal adjacente às lesões neoplásicas. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos diagnósticos analisados. A presença de células multinucleadas em lesões tumorais tem sido descrita especialmente em tumores pouco diferenciados, e sua formação tem sido interpretada como decorrente mais provavelmente de fusão celular (por anormalidades de membrana de célula neoplásica), associada a agentes virais indutores de fusão celular, e menos provavelmente de uma divisão nuclear repetida com falha na separação celular. Um tipo adicional de célula gigante também observada em lesões tumorais é a célula gigante associada a neoplasia, também denominadas células reativas não tumorais (CHAMBERS, 1978). No presente estudo, não foram observadas células multinucleadas expressando Ki-67, tornando pouco provável a hipótese de serem decorrentes de uma divisão nuclear com falha na separação celular. Ainda, estas células demonstraram consistentemente a imunomarcagem membranar pela E-caderina, e foram observadas em meio aos lóbulos glandulares hepatoides, e não em estroma, e com morfologia nuclear e citoplasmática semelhante às células hepatoides adjacentes, descartando-se a hipótese de se tratarem de células gigantes reativas não tumorais. A possibilidade de um efeito citopático viral parece bastante improvável, já que há evidências consistentes da participação de estímulo hormonal na oncogênese dos tumores hepatoides. Estas multinucleações representam, mais provavelmente, uma fusão de células hepatoides, mas curiosamente foram observadas tanto em tumores benignos quanto em tumores malignos (isto é, não associadas a anaplasia), assim como em tecido glandular não neoplásico adjacente. Estes achados são importantes do ponto de vista diagnóstico: a presença de células gigantes multinucleadas foi interpretada como um critério citopatológico de malignidade (embora não isoladamente) em um estudo de comparação cito-histológica de tumores hepatoides (YUMUŞAK; ÇALIŞKAN; KUTSAL, 2016). No entanto, o presente estudo sugere que

este critério pode não ter tanto valor na distinção entre tumores benignos e malignos, e é importante que o patologista tenha cautela em sua interpretação, ao menos para as neoplasias hepatoides.

Com relação à frequência de casos de tumores malignos dentro do levantamento sequencial dos 57 tumores hepatoides, foi observada uma diferença percentual importante entre os diferentes patologistas, com proporções de casos de tumores malignos variando de 26,3% a 50,9% dos casos. Este achado indica que a variação diagnóstica entre os patologistas é um importante critério que pode explicar parte das variações observadas em diferentes levantamentos em literatura veterinária (Quadro 1). Este achado serve para alertar o oncologista de que a literatura veterinária concernente aos tumores hepatoides deve ser interpretada sob esta perspectiva, e que outros critérios além do diagnóstico histopatológico devem ser considerados ao conduzir um caso com diagnóstico de neoplasia hepatoide maligna. Apesar da elevada proporção de casos de tumores malignos diagnosticada por alguns dos patologistas, apenas poucos casos deste levantamento sequencial se comportaram de maneira agressiva durante o período de seguimento avaliado: de 28 casos desta amostragem sequencial incluída em seguimento, foram observadas recorrências locais em apenas 4 casos (14,2%) e óbito associado a possível doença metastática em apenas 3 casos (10,7%). Embora estes achados possam indicar uma discrepância entre os critérios morfológicos aplicados pelos patologistas e o real comportamento biológico da neoplasia, deve-se ponderar que o período de seguimento neste estudo foi relativamente limitado, com média de 547,36 dias, não sendo possível descartar a possibilidade destas outras neoplasias desenvolverem recorrências ou metástases em um período mais prolongado. Em um relato de caso recente, Jardim et al. (2018) descreveram um caso de carcinoma hepatoide primário de região intrapélvica, mas este paciente havia apresentado um tumor perianal diagnosticado como adenoma 6 anos antes, e a relação deste diagnóstico com a lesão intrapélvica não foi bem esclarecida.

Apesar desta variação percentual de diagnóstico entre os patologistas, em análise de concordância interobservador, com relação ao diagnóstico final, foi observada uma concordância média razoável ($\kappa=0,54$), com 3 dos 10 pares de comparação demonstrando uma boa concordância ($\kappa=0,6-0,74$). Nakhleh (2015) sugeriu que valores de κ entre 0,4 a 0,6 podem ser aceitos na maioria dos sistemas de classificação. Em literatura veterinária, Chu, Liao e Liu (2011) relataram um valor médio de κ de 0,43 (concordância razoável) na distinção entre adenomas e carcinomas mamários caninos, incluindo a análise de 10 patologistas, todos com ao menos 10 anos de experiência. Em patologia humana, alguns exemplos de estudos de avaliação de concordância interobservador para uma variedade de lesões podem ser destacados. Em pólipos colorretais, a distinção

entre uma lesão adenomatosa para um carcinoma (*in situ* ou invasivo) tem demonstrado concordância variável, com κ variando de 0,42 a 0,78 (TERRY et al., 2002; COSTANTINI et al., 2003). Para esta lesão em particular, Terry et al. (2002) demonstraram que o uso de uma classificação mais ampla (alto grau vs. baixo grau) confere uma maior concordância em comparação com uma classificação em múltiplas categorias. Zen et al. (2007) investigaram a concordância entre patologistas na distinção entre lesões biliares pré-malignas e neoplásicas não invasivas, em 4 categorias de classificação, por 17 patologistas, com concordância diagnóstica moderada ($\kappa=0,45$). Para lesões cutâneas melanocíticas, Duncan et al. (1993) demonstraram um excelente grau de concordância na distinção entre nevo melanocítico e melanoma (κ variando de 0,83 a 1), e pouco menor na distinção entre nevo, nevo displásico e melanoma (κ variando de 0,55 a 0,84). Portanto, fica claro que, embora os resultados observados no presente trabalho sejam comparáveis com alguns estudos, tanto em literatura veterinária quanto médica, existe o potencial de melhora dos índices de concordância, tornando oportuna a tentativa de elaboração de critérios diagnósticos de maior concordância para os tumores hepatoides em cães.

Em relação à confecção desta classificação diagnóstica, a proposta inicial deste trabalho era caracterizar os tumores hepatoides em três categorias, considerando uma categoria limítrofe (*borderline*) entre os tumores benignos e malignos. No entanto, em diversas árvores de regressão elaboradas com desfecho em três categorias diagnósticas, não foi possível obter uma maior concordância entre os patologistas. Ao contrário, houve ocorrências de diminuição da concordância com a aplicação destas árvores. Uma situação semelhante tem sido observada em literatura veterinária para o mastocitoma cutâneo canino, no qual a graduação dicotômica de Kiupel et al. (2011) tem demonstrado um grau de concordância maior que a classificação anterior de Patnaik, Ehler e MacEwen (1984), composta de 3 categorias (KIUPEL et al., 2011), e também em literatura médica, como nos métodos de classificação de pólipos colorretais investigados por Terry et al. (2002), como já discutido. Assim, optou-se pela elaboração de árvores diagnósticas frente a duas categorias diagnósticas (tumores benignos vs. tumores malignos), considerando os critérios de maior concordância entre os patologistas e em comparação com diferentes métodos de desfechos diagnósticos. Com esta abordagem, foi possível elaborar métodos de classificação com potencial para melhorar a reprodutibilidade entre os patologistas. Dentre os diversos algoritmos obtidos em análise de árvore de decisão, foram escolhidos aqueles com menor complexidade, já que árvores muito complexas podem perder seu poder de predição para uma amostragem distinta (*overfitting*). Os critérios morfológicos incluídos nos algoritmos diagnósticos correspondem, em certa medida, àqueles que também demonstraram maior grau de reprodutibilidade interobservador. Convém ressaltar

que os algoritmos diagnósticos apresentados neste estudo não se propõem a serem aplicados de imediato em rotina diagnóstica ou de pesquisa, já que se faz necessária a validação desta classificação em uma série adicional de casos e, preferencialmente, com a participação de patologistas distintos. Ainda, estudos adicionais devem ser realizados para investigar se existe significância clínica nestas propostas de classificação. A aplicação de um novo método de classificação deve ser justificável apenas se se traduzir em uma maior eficiência de prever características prognósticas, já que sistemas de classificação bem sucedidos devem não apenas serem simples e reprodutíveis, mas também ter relevância clínica (NAKHLEH, 2015). Alternativamente, há a possibilidade de elaboração de consensos entre patologistas com relação aos critérios morfológicos e diretrizes diagnósticas, com atenção especial àqueles critérios que demonstraram indícios de ter potencial de predição de eventos prognósticos, como grau de infiltração, perda de polaridade celular e invasão vascular (discutidos mais adiante).

A expressão de vimentina em células neoplásicas em tumores de glândula hepatoide tem sido estudada por outros autores, e o mecanismo de EMT tem sido proposto como provável justificativa para esta ocorrência, mas a concomitante perda de marcadores epiteliais não foi investigada (ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN et al., 2016). No presente trabalho, foi aventada a hipótese de que uma maior expressão imuno-histoquímica de vimentina em tumores hepatoides estaria acompanhada de uma menor expressão de marcadores epiteliais, tais como pancitoqueratina e E-caderina. Ainda, pretendeu-se avaliar a proporção de células neoplásicas com perfil fusiforme como um critério morfológico adicional que pudesse indicar a ocorrência de EMT, já que a mera expressão de marcadores típicos de células mesenquimais pode não ser suficiente para caracterizar este processo (HAY, 2005). A presença de células neoplásicas com perfil fusiforme em tumores hepatoides tem sido vagamente descrita em literatura (BERROCAL et al., 1989), mas sua quantificação não havia sido avaliada. No presente estudo, além da maior expressão de vimentina observada em tumores malignos em comparação com tumores benignos e glândulas normais, foi observada concomitante perda de expressão de E-caderina, mais notadamente em células de reserva, e, em menor grau, perda de expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas. A proporção de células neoplásicas com perfil fusiforme também foi maior para neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas, embora a maioria dos tumores tenha demonstrado uma baixa proporção de células com perfil fusiforme. Nas correlações investigadas, boa parte dos resultados suportam a EMT, mais notadamente a forte correlação negativa entre a expressão de vimentina em células de reserva e expressão de pancitoqueratina em células diferenciadas.

Para 58,6% dos casos infiltrativos avaliados, foi observada a perda ou diminuição de intensidade de imunomarcagem de E-caderina em bordo infiltrativo da neoplasia, sugerindo sua importância no processo de invasão tecidual. De maneira semelhante, também foi observada expressão de vimentina e perda da expressão de pancitoqueratina nestas áreas em 71,9% e 30,8% dos casos, respectivamente. Esta avaliação imuno-histoquímica, especificamente em áreas infiltrativas, tem sido investigada por alguns autores para outros processos neoplásicos, como carcinomas de células escamosas e tumores foliculares, e enfatiza a importância biológica da expressão destas proteínas no processo de invasão tecidual no contexto da EMT (BONGIOVANNI et al., 2013; NAGAMINE et al., 2017). Além das correlações obtidas em análise de escores de expressão dos marcadores avaliados, como já discutido, procurou-se identificar também áreas com concomitância da perda de expressão de marcadores epiteliais e expressão de vimentina. Assim, foram observados casos com áreas de concomitante perda de expressão de marcadores epiteliais e expressão de vimentina, bem como concomitância de aspecto morfológico fusocelular e expressão de vimentina (em 77,6% dos casos), embora a associação deste critério com a perda de marcadores epiteliais não tenha sido tão consistente. Esta comparação topográfica foi realizada comparando-se secções distintas lado a lado, mas sugere-se que, para uma melhor caracterização deste processo, sejam realizados testes adicionais com dupla marcação imuno-histoquímica para melhor apreciação da relação destas proteínas na topografia tecidual.

Com relação à atividade proliferativa, a perda da expressão de E-caderina tem sido associada a uma maior atividade proliferativa de células neoplásicas, pelo aumento da atividade transcricional de β -catenina (STOCKINGER et al., 2001). Esta hipótese é parcialmente suportada pelos achados do presente estudo: enquanto que uma correlação negativa fraca a moderada foi observada entre a expressão de E-caderina e contagem de mitoses, o mesmo não foi observado com relação à taxa de proliferação (Ki-67), apesar da forte correlação entre este índice e a contagem de mitoses. Embora esta discrepância não esteja devidamente esclarecida, deve-se considerar a possibilidade de não detecção deste efeito pela não possibilidade de avaliação imuno-histoquímica por Ki-67 de boa parte dos casos (17,9%), ao passo que a contagem de mitoses foi realizada em todas as amostras.

Dentre as variáveis incluídas na investigação da EMT, destaca-se que o escore de expressão de E-caderina (em células diferenciadas ou em células de reserva) demonstrou indícios de ter valor prognóstico com relação aos desfechos investigados. Ainda, o escore de morfologia fusiforme demonstrou valor prognóstico para recorrência (recorrência local ou recorrência de doença). Estes achados sustentam a participação do mecanismo de EMT na progressão tumoral, e se assemelham ao observado em outros estudos, como

a associação entre perda de expressão da E-caderina, menor sobrevida e menor intervalo livre de doença em carcinomas mamários caninos (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008) e em carcinomas mamários invasivos em humanos (PARK et al., 2007). Uma morfologia celular de aspecto fusiforme tem sido descrita também para uma parte dos casos de carcinomas renais em cães, uma neoplasia que frequentemente demonstra marcação positiva para vimentina, mas não foi encontrada associação deste padrão sarcomatoide com sobrevida (EDMONDSON; HESS; POWERS, 2015)

A taxa de proliferação celular (Ki-67) tem sido amplamente utilizada em diversos estudos em oncopatologia, e tem se demonstrado uma ferramenta importante para o estabelecimento de prognóstico de uma série de neoplasias. Em literatura veterinária, o Ki-67 tem demonstrado especial importância em casos de mastocitoma e melanomas, demonstrando consistentemente valor preditivo de características prognósticas (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; LAPRIE et al., 2001). No presente estudo, as taxas de proliferação celular (Ki-67) se assemelham parcialmente às relatadas por Pereira et al. (2013) para tumores de glândula hepatoide, com técnica de avaliação semelhante. Enquanto que a taxa de proliferação para neoplasias malignas observadas no presente estudo (de 16%) se aproxima do valor de 17% obtido por Pereira et al. (2013)(considerando os epiteliomas e carcinomas), foi observado um valor maior de proliferação celular para os tumores benignos, de 7%, em comparação com os 1,7% de Pereira et al. (2013) para os adenomas. Além de fatores técnicos inerentes da análise de imunoexpressão de Ki-67 (como variações em detecção de *hot-spots*), é possível que esta variação seja, em parte, explicada por diferentes métodos de classificação diagnóstica. Neste contexto, é possível que casos com morfologia semelhante a uma parte dos casos interpretados como adenomas no presente trabalho tenham sido classificados como epitelioma por Pereira et al. (2013), e que apenas casos bem diferenciados e sem atipias tenham sido incluídos na classificação de adenoma. Esta diferença enfatiza, mais uma vez, a importância de se padronizar os critérios de classificação diagnóstica com vias a preservar a reprodutibilidade e permitir uma melhor comparação de diferentes estudos.

Na comparação entre os diferentes grupos diagnósticos, foi observada uma diferença na taxa de proliferação celular entre os tumores benignos e malignos (não vasculoinvasivos e não metastáticos), porém não foi observada diferença entre os tumores malignos não vasculoinvasivos e aqueles vasculoinvasivos ou metastáticos. Ainda, não foi observado valor prognóstico do Ki-67 para nenhum dos desfechos clínicos avaliados. Pereira et al. (2013) tampouco demonstraram valor prognóstico do Ki67 utilizando-se de método semelhante de análise, embora tenham demonstrado que, com um método computadorizado de contagem de células Ki67⁺(considerando a área de marcação nuclear,

e não a contagem celular), foi possível prever a recorrência dos carcinomas. No presente estudo, em uma parte dos casos em seguimento, não foi possível aferir com segurança as taxas de proliferação celular (Ki-67) devido a artefatos de fixação das amostras, e este fator pode ter diminuído a chance de detecção de diferença considerando a amostragem utilizada. No entanto, a contagem de mitoses, que demonstrou uma correlação forte com o Ki-67, estava disponível para todos os casos em seguimento, e tampouco demonstrou valor prognóstico ou diferenças entre os grupos vasculoinvasivos/metastáticos e não vasculoinvasivos. É possível que, para tumores hepatóides, a taxa de proliferação celular, de maneira isolada, não tenha tanta importância para a predição prognóstica, e outros fatores devem estar envolvidos na taxa de crescimento tumoral, como, por exemplo, o envolvimento de fatores antiapoptóticos. Martins et al. (2008), por exemplo, relataram a ocorrência de taxas variáveis de apoptose entre os diferentes tipos de tumores hepatóides, com maiores taxas em tumores malignos (embora não esteja claro o grau de contribuição destas altas taxas para a massa tumoral), e há também evidências de tumores hepatóides malignos demonstrando superexpressão da proteína p53, indicativa de uma proteína disfuncional (GAMBLIN; SAGARTZ; COUTO, 1997).

Embora não tenha demonstrado valor prognóstico, o presente estudo indica que a avaliação da proliferação celular (Ki-67) pode ter sua utilidade na obtenção de uma maior precisão diagnóstica. Em avaliação de curva ROC, foi obtido um ponto de corte de 6,5 a 7%, acima do qual o diagnóstico de neoplasia maligna pode ser obtido com uma alta sensibilidade (85,7 a 100%), embora com uma especificidade baixa (56,7 a 66,7%). Esta baixa especificidade observada indica que a aplicação da imuno-istoquímica para Ki-67 pode ter maior utilidade para descartar o diagnóstico de neoplasia maligna, enquanto que valores positivos (>6,5 a 7%) podem não permitir a conclusão diagnóstica com segurança. Ressalta-se que, no presente trabalho, a análise da taxa de proliferação (Ki-67) foi realizada por apenas um patologista e aplicada em relação aos diagnósticos dos cinco patologistas. Embora haja evidências de que esta avaliação demonstre um alto grau de concordância entre observadores (LAENKHOLM et al., 2018), sugere-se que estudos adicionais sejam realizados, comparando o grau de concordância entre diferentes patologistas na categorização dos diagnósticos de acordo com a utilização deste marcador.

Neste estudo, devido à não possibilidade de obtenção de amostragens de animais sadios para confecção de grupo controle na comparação de marcações imuno-histoquímicas, optou-se por utilizar o tecido glandular não neoplásico adjacente às lesões tumorais para este fim. Embora tenha sido observada uma diferença de expressão de vimentina e E-caderina em células de reserva entre tecido tumoral e tecido glandular adjacente, foram observados alguns casos com marcação fora do usual nesta região:

alguns casos demonstraram um grau relativamente elevado de escores de expressão de vimentina e, para alguns casos, foi observada também uma expressão atípica de E-caderina, seja caracterizada por perda de expressão em células de reserva, seja pela presença de expressão citoplasmática difusa. Foi observada também uma quantidade importante de casos com presença de células sinciciais/multinucleadas em tecido glandular adjacente. Estes achados podem indicar a ocorrência do efeito de campo (cancerização tecidual) em tumores de glândula hepatoide. O fenômeno do efeito de campo tem sido teorizado para justificar a ocorrência de apresentação multicêntrica para uma variedade de lesões neoplásicas, e se caracteriza pela presença de um campo expansivo pré-neoplásico em tecido adjacente à neoplasia, em que as células não neoplásicas podem já demonstrar a presença de algumas das alterações genéticas presentes na lesão tumoral (CHAI; BROWN, 2009). De fato, a ocorrência de apresentação como múltiplas lesões nodulares hepatoides, observada em 27,4% dos casos neste estudo, e em 7,6% a 31,7% dos casos por outros autores (MULLIGAN, 1949; VAIL et al., 1990) reforça a hipótese da ocorrência de efeito de campo para esta neoplasia em particular. Uma possível justificativa seria a possibilidade de haver uma relativa homogeneidade de exposição de tecido hepatoide ao constante estímulo androgênico presente em animais não castrados. Não se descarta a possibilidade destas alterações morfológicas observadas em tecido adjacente poderem corresponder a eventos pré-neoplásicos. Hipóteses adicionais a serem testadas futuramente incluem a investigação do impacto da presença destas alterações em tecido adjacente em taxas de recorrência, bem como investigar se estas alterações são observadas com maior frequência quando da apresentação como lesões nodulares múltiplas.

Alguns autores tem interpretado as recorrências de tumores de glândula hepatoide como tumores *de novo*, e não como recidivas propriamente ditas, estando possivelmente associadas à não castração do paciente e persistência do estímulo androgênico (BERROCAL et al., 1989; GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992). No presente trabalho, no entanto, foi observada uma associação entre o comprometimento de margens cirúrgicas e a recidiva local em análise univariada, com recidiva local em 22,6% dos casos com margens comprometidas, sugerindo que ao menos uma parte dos casos possa corresponder a recidivas tumorais propriamente ditas. Diferentemente do descrito por Scarpa et al. (2012) para carcinomas, sarcomas e mastocitomas em cães, no presente trabalho não foi observado valor prognóstico adicional em se categorizar as margens não comprometidas como livres ou estreitas, embora deva ser considerada a possibilidade de não detecção deste efeito devido à baixa amostragem. Adicionalmente, foi observada também, em análise univariada, associação entre a não castração do paciente após o

diagnóstico e a recorrência local (com 20% de animais não castrados demonstrando recorrência em 1 ano, contra 7,9% em castrados), indicando que uma parte dos casos possam representar, de fato, ocorrências *de novo* (esta associação foi independente de o animal ser castrado ou inteiro no momento da apresentação clínica). Assim, para melhor esclarecimento da relação entre margens cirúrgicas, não castração e recorrências tumorais, sugere-se que novos estudos sejam realizados com uma maior amostragem, para permitir a realização de uma análise multivariada.

No presente trabalho, a maioria dos casos classificados como tumores malignos não vasculoinvasivos/metastáticos demonstrou um bom prognóstico durante o período de seguimento disponível, com 4 casos (26%) demonstrando recorrências da doença e apenas 2 (13,3%) com provável óbito associado à doença. De maneira contrária, o grupo dos carcinomas vasculoinvasivos/metastáticos demonstraram recorrência da doença em 66,6% dos casos, além do provável óbito associado à doença em 4 animais. Estes achados são consistentes com o relatado por Vail et al. (1990), que demonstraram um pior prognóstico (menor sobrevida e menor intervalo livre de recorrência) para carcinomas hepatóides apresentando-se com metástase, e a taxa de recorrência para carcinomas não invasivos é semelhante à descrita por Berrocal et al. (1989) para os casos que categorizou como "tumores moderadamente ou pouco diferenciados". Em trabalho de Pereira et al. (2013), 20% e 66,6% dos casos de epiteloma e carcinoma, respectivamente, demonstraram recorrência de doença neoplásica, mas não foram relatadas metástases (mas o tempo total de seguimento dos pacientes não foi relatado). Embora não esteja clara a justificativa para esta proporção maior de casos com recorrências descritos por Pereira et al. (2013), o presente estudo demonstrou evidências de que alguns fatores, como comprometimento de margens cirúrgicas e não castração após o diagnóstico, podem ter algum impacto na taxa de recorrência, e são fatores que podem ter introduzido estas variações.

Um fator que pode explicar, em parte, as recorrências em seguimento é a apresentação como doença tumoral recorrente: do total de 33 casos incluídos em seguimento, havia histórico prévio de neoplasia hepatoide em 3 (9%), e este critério demonstrou poder preditivo para a recorrência da doença (local ou à distância) em análise univariada. De maneira semelhante, para mastocitomas, Horta et al. (2018) demonstraram que a presença de histórico de tumor recorrente é um critério preditivo independente de sobrevida global.

Em análise univariada, o grau de infiltração demonstrou ser preditivo de recorrência local, com 33,3% de recorrências observadas em 1 ano em casos caracterizados como parcialmente ou predominantemente infiltrativos. Estes achados indicam que

este é um importante critério a ser investigado em estudos futuros, e considerando sua baixa concordância em análise interobservador ($ICC=0,21$), é altamente indicado que em estudos adicionais seja realizada uma etapa prévia de confecção de uma definição mais rigorosa dos critérios necessários para se caracterizar infiltração estromal, visando a otimizar a reprodutibilidade e poder preditivo, para que seja eventualmente aplicado em prática clínica.

O tamanho tumoral surgiu como um critério preditivo de sobrevida global e sobrevida doença específica, com tumores maiores que 2,4 cm (maior dimensão) demonstrando 64,2% e 70% de sobrevida global e sobrevida doença-específica em 1 ano, respectivamente. A relação entre o tamanho tumoral e o prognóstico é consistente com o relatado por Vail et al. (1990), que demonstraram uma menor sobrevida para casos com estadiamento $T \geq 3N \times Mx$ (tumor maior que 5 cm) em comparação com casos $T \leq 2N \times Mx$, embora o ponto de corte obtido no presente trabalho tenha sido distinto. Novamente enfatiza-se a possibilidade dos tamanhos descritos no presente trabalho estarem subestimados por serem oriundos das descrições de relatórios anatomopatológicos, e não de informações clínicas.

Para dois casos de carcinomas incluídos em seguimento, houve tentativa de tratamento quimioterápico, um deles com vincristina, doxorubicina e ciclofosfamida (com manutenção com ciclofosfamida em dose metronômica), e em outro caso com o uso de carboplatina. A eficácia do uso destes tratamentos para tumores de glândula hepatoide não está bem esclarecida em literatura veterinária, mas em recente relato de caso, Jardim et al. (2018) descreveram uma percepção de melhoria de sintomatologia clínica e melhoria de qualidade de vida em um paciente portador de carcinoma hepatoide intrapélvico com a aplicação de quimioterapia metronômica com piroxicam e ciclofosfamida. No presente estudo, de maneira inesperada, a instituição de quimioterapia surgiu como um fator de risco para todos os desfechos avaliados. No entanto, esta informação deve ser interpretada com extrema cautela: apenas 2 dos 33 casos incluídos em seguimento foram submetidos ao tratamento quimioterápico, sendo que um deles teve o diagnóstico de carcinoma com invasão vascular (com a comunicação de invasão vascular informada no laudo original encaminhado ao oncologista à época), e o outro cursou com outro processo neoplásico concomitante (carcinoma de vesícula urinária). Portanto, esta associação pode refletir meramente a seleção de casos com uma percepção de pior prognóstico, e não de fato um fator de risco real. Estudos adicionais são sugeridos para melhor compreensão do real impacto das diversas modalidades de tratamento quimioterápico, preferencialmente controlando para estadiamento e para características clínicas e morfológicas preditivas descritas neste estudo.

Algumas limitações e dificuldades devem ser mencionadas para a adequada interpretação dos resultados deste trabalho. Por se tratar de estudo retrospectivo, não foi possível garantir condições ótimas de fixação das amostras em etapa pré-analítica, e em alguns casos foi observada marcação não homogênea na análise imuno-histoquímica, atribuída a artefatos de fixação. Para mitigar este efeito, as áreas com artefatos não foram contabilizadas para a elaboração do escore imuno-histoquímico, e casos com excesso de artefatos foram excluídos da análise. No entanto, não se descarta a possibilidade destes artefatos terem introduzindo algum grau de inconsistência nas diversas análises imuno-histoquímicas realizadas. Idealmente, sugere-se que o estudo seja replicado em uma amostragem prospectiva e com controle pré-analítico para confirmação de achados.

A classificação dos tumores malignos em um subgrupo de casos com invasão vascular ou metástase foi realizada com o propósito de investigar possíveis diferenças na sobrevida e na imunoexpressão de marcadores associados à EMT ou proliferação celular. No entanto, especificamente na categorização de invasão vascular, deve-se considerar que a classificação se baseou apenas em análise de secções histopatológicas, e não se descarta uma certa imprecisão nesta abordagem. Harris et al. (2008) demonstraram um grau de concordância interobservador ruim na detecção de invasão vascular em análise histopatológica ($\kappa=0,28$ e $0,18$ para invasão em pequenos e grandes vasos, respectivamente) para casos de carcinomas colorretais em humanos. Mills et al. (2015) utilizaram, em complementação com a análise histopatológica, a aplicação do exame imuno-histoquímico com fator de Von Willebrand para amplificar a acurácia de detecção de invasão vascular em casos duvidosos dentre uma série de casos de carcinoma mamários em felinos. Assim, no presente estudo, não se descarta a possibilidade de alguns casos com invasão vascular não terem sido detectados pela não aplicação de técnicas mais acuradas. Na análise interobservador, não foi possível avaliar o grau de concordância para este critério (análise não significativa), devido à baixa frequência de ocorrência vascular em levantamento sequencial. Ainda, em análise de sobrevida, apenas um caso com invasão vascular (e sem metástase no momento do diagnóstico) foi possível de ser acompanhando por um período mais prolongado, sendo recomendada a realização de estudos adicionais com uma amostragem maior de casos vasculoinvasivos para melhor definição do valor prognóstico deste critério isoladamente.

Com relação à análise de sobrevida, houve dificuldade em se categorizar óbitos como associados ou não à doença, devido à não realização de estudo necroscópico nos casos em seguimento. Casos em que o clínico informou haver outras neoplasias concomitantes (passíveis de evoluir para doença metastática e óbito) foram excluídos da análise de sobrevida específica, mas optou-se por mantê-los na análise de sobrevida global

por conta desta incerteza. Com relação às instâncias de doença metastática (à exceção daquelas incluídas no momento inicial, dos carcinomas vasculoinvasivos/metastáticos), ressalta-se que a maioria dos diagnósticos foi obtido por meio de exames de imagem (ultra-som ou raio-x), e não foi relatada confirmação de diagnóstico por meio de exame histopatológico. Esta confirmação é importante, tanto para distinguir linfadenomegalia reacional/hiperplásica de metástase, quanto para descartar a possibilidade de uma lesão neoplásica de outra histogênese. Adicionalmente, a dificuldade de se obter um detalhamento de histórico e seguimento clínico é um grande entrave bem reconhecido em literatura veterinária, seja pela dificuldade de se contactar os tutores dos animais, seja pela variação de percepções dos tutores com relação ao valor que seus animais tem em sua vida, o que pode afetar, por exemplo, decisões sobre tratamentos ou eutanásia (MEUTEN; MUNDAY; HAUCK, 2018).

Com relação à investigação das associações das diversas variáveis com os desfechos prognósticos, a principal limitação foi a baixa amostragem. Como este estudo foi desenvolvido primariamente para investigar as concordâncias diagnósticas entre diferentes observadores, optou-se por não levantar inicialmente uma casuística elevada, para que fosse possível que múltiplos patologistas avaliassem os casos (e mesmas lâminas). Ainda, para o grupo adicional de casos com invasão vascular ou com metástase confirmada em histopatologia, foram encontrados poucos casos em arquivo, por serem de ocorrência rara, e para alguns casos mais antigos não foi possível mais obter contato com os tutores ou obter informações de prontuário. Considerando a quantidade de variáveis investigadas, o volume de eventos do presente estudo está bastante aquém do sugerido em recentes diretrizes para estudos de sobrevida em literatura veterinária, que sugerem idealmente que haja 10 vezes o número de eventos em relação às variáveis prognósticas incluídas no modelo (WEBSTER et al., 2011). Portanto, com exceção dos critérios de apresentação como doença metastática e tamanho tumoral, que reproduzem de maneira satisfatória os achados descritos por Vail et al. (1990), as demais variáveis prognósticas elencadas no presente estudo, a despeito da plausibilidade biológica para muitas delas, devem ser interpretadas mais adequadamente como novas hipóteses a serem retestadas futuramente. Dessa maneira, garante-se que resultados potencialmente falso positivos não sejam, de imediato, aplicados na prática clínica.

7 CONCLUSÕES

Baseando-se nos achados clínico-epidemiológicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos dos tumores de glândula hepatoide em cães, pode-se concluir que:

- Existe um grau de concordância interobservador razoável no diagnóstico dos tumores de glândula hepatoide em cães;

- Há potencial de melhora de concordância diagnóstica entre patologistas com a aplicação dos novos algoritmos diagnósticos desenvolvidos;

- Os achados imuno-histoquímicos demonstraram que o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal participa na progressão tumoral da glândula hepatoide;

- A taxa de proliferação celular (Ki-67) foi maior nos tumores malignos, com ponto de corte de 6,5% a 7% para a diferenciação de tumores benignos;

- A presença de invasão vascular ou metástase no momento do diagnóstico apresentaram valor prognóstico na sobrevida de cães com tumores de glândula hepatoide, assim como houve indícios de outras características associadas à recorrência da doença e sobrevida, tais como: escore de E-caderina, morfologia fusiforme, grau de infiltração, perda de polaridade celular, castração após o diagnóstico, margens cirúrgicas, histórico de doença recorrente, proporção de células de reserva, diferenciação sebácea e tamanho tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, J.; AMARDEILH, M.; DELVERDIER, M. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 215, n. 11, p. 1629–1634, Dec. 1999.
- ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, S.; KUKOLJ, V.; MARINKOVIĆ, D.; KNEŽEVIĆ, M. A. Retrospective study of canine epithelial and melanocytic tumors. **Acta veterinaria**, Belgrado, v. 55, n. 4, p. 319–326, 2005.
- ALEXANDER, J.; APPEL, G.; DELAHUNTA, A.; DUELAND, R. A malignant neoplasm resembling a circumanal gland adenocarcinoma in a dog. **Cornell veterinarian**, Ithaca, v. 66, n. 1, p. 97–104, Jan. 1976.
- ANDERSON, C. R.; MCNIEL, E. A.; GILLETTE, E. L.; POWERS, B. E.; LARUE, S. M. Late complications of pelvic irradiation in 16 dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v. 43, n. 2, p. 187–192, Mar. 2002.
- ANDRADE, R. L. F. S.; OLIVEIRA, D. M.; DANTAS, A. F. M.; SOUZA, A. P. de; NETO, P. I. da N.; RIET-CORREA, F. Tumores de cães e gatos diagnosticados no semiárido da paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 10, p. 1037–1040, out. 2012.
- ASSUNÇÃO, K. A. da. **Estudo clínico-cirúrgico, citológico e histopatológico de tumores perineais em cães**. 2003. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs—a systematic review. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 314–322, Jun. 2012.
- BELLUCO, S.; BRISEBARD, E.; WATRELOT, D.; PILLET, E.; MARCHAL, T.; PONCE, F. Digital squamous cell carcinoma in dogs: epidemiological, histological, and imunohistochemical study. **Veterinary pathology**, Basel, v. 50, n. 6, p. 1078–1082, Jun. 2013.
- BERROCAL, A.; VOS, J. H.; INGH, T. S. G. A. M.; MOLENBEEK, R. F.; SLUIJS, F. J. Canine perineal tumours. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, Berlim, v. 36, n. 1-10, p. 739–749, Dec. 1989.
- BHAIYAT, M. I.; CHIKWETO, A.; TIWARI, K. P.; DEALLIE, C.; PAWAIYA, R. S.; INGA, A.; HEGAMIN-YOUNGER, C.; SHARMA, R. N. A retrospective study of canine tumors in Grenada, West Indies. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, Paquistão, v. 1, n. 5, p. 134–139, 2013.

- BONGIOVANNI, L.; D'ANDREA, A.; ROMANUCCI, M.; MALATESTA, D.; CANDOLINI, M.; SALDA, L. D.; MECHELLI, L.; SFORNA, M.; BRACHELENTE, C. Epithelial-to-mesenchymal transition: immunohistochemical investigation of related molecules in canine cutaneous epithelial tumours. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 195–e43, Jan. 2013.
- BRACAMONTE, E.; GIBSON, B. A.; KLEIN, R.; KRUPINSKI, E. A.; WEINSTEIN, R. S. Communicating uncertainty in surgical pathology reports: A survey of staff physicians and residents at an academic medical center. **Academic pathology**, v. 3, p. 2374289516659079, Jul. 2016.
- BRODZKI, A.; SOBCZYNSKA-RAK, A.; BRODZKI, P.; TATARA, M. R.; SILMANOWICZ, P. Występowanie, etiologia i antyhormonalne leczenie guzów okolicy odbytu u psów samców. **Medycyna Weterynaryjna**, Lublin, v. 70, n. 10, p. 638–643, 2014.
- BRONNER, M. E. Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, v. 138, n. 2, p. 179–186, Aug. 2012.
- BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. E-cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 42, n. 6, p. 781–787, Nov. 2005.
- BUENDIA, A. J.; PENAFIEL-VERDU, C.; NAVARRO, J. A.; VILAFRANCA, M.; SANCHEZ, J. N-cadherin expression in feline mammary tumors is associated with a reduced e-cadherin expression and the presence of regional metastasis. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 51, n. 4, p. 755–758, Jul. 2014.
- BURGESS, H. J.; KERR, M. E. Cytokeratin and vimentin co-expression in 21 canine primary pulmonary epithelial neoplasms. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Thousand Oaks, v. 21, n. 6, p. 815–820, Nov. 2009.
- BUSSOLATI, G. Dissecting the pathologist's brain: mental processes that lead to pathological diagnoses. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 448, n. 6, p. 739–43, Jun. 2006.
- CALIARI, D.; ZAPPULLI, V.; RASOTTO, R.; CARDAZZO, B.; FRASSINETI, F.; GOLDSCHMIDT, M. H.; CASTAGNARO, M. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. **BMC veterinary research**, BioMed Central, Londres, v. 10, n. 1, p. 185, Sept. 2014.
- CAMPOS, M.; DUCATELLE, R.; RUTTEMAN, G.; KOOISTRA, H. S.; DUCHATEAU, L.; ROOSTER, d. H.; PEREMANS, K.; DAMINET, S. Clinical, pathologic, and immunohistochemical prognostic factors in dogs with thyroid carcinoma. **Journal of veterinary internal medicine**, Philadelphia, v. 28, n. 6, p. 1805–1813, Nov. 2014.
- CERVANTES-ARIAS, A.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. **Veterinary and comparative oncology**, Nova Jérsei, v. 11, n. 3, p. 169–184, Sept. 2013.

CHAFFER, C. L.; BRENNAN, J. P.; SLAVIN, J. L.; BLICK, T.; THOMPSON, E. W.; WILLIAMS, E. D. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. **Cancer research**, Baltimore, v. 66, n. 23, p. 11271–11278, Dec. 2006.

CHAI, H.; BROWN, R. E. Field effect in cancer—an update. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v. 39, n. 4, p. 331–337, Fall. 2009.

CHAISIRI, N.; PIERREPOINT, C. G. Steroid—receptor interaction in a canine anal adenoma. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 405–416, Jul. 1979.

CHAMBERS, T. J. Multinucleate giant cells. **The Journal of pathology**, Nova Jérsei, v. 126, n. 3, p. 125–148, Nov. 1978.

CHEN, J.; WANG, L.; MATYUNINA, L. V.; HILL, C. G.; MCDONALD, J. F. Overexpression of mir-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (met) in metastatic ovarian cancer cells. **Gynecologic oncology**, Nova Iorque, v. 121, n. 1, p. 200–205, Apr. 2011.

CHRISTOPHER, M. M.; HOTZ, C. S. Cytologic diagnosis: expression of probability by clinical pathologists. **Veterinary clinical pathology**, Nova Jérsei, v. 33, n. 2, p. 84–95, Mar. 2004.

CHU, P.-Y.; LIAO, A. T.; LIU, C.-H. Interobserver variation in the morphopathological diagnosis of canine mammary gland tumor among veterinary pathologists. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 9, n. 4, p. 388–391, 2011.

CICCHETTI, D. V. Guidelines, criteria, and rules of thumb for evaluating normed and standardized assessment instruments in psychology. **Psychological assessment**, Arlington, v. 6, n. 4, p. 284, Dec. 1994.

CICCHETTI, D. V.; SPARROW, S. A. Developing criteria for establishing interrater reliability of specific items: applications to assessment of adaptive behavior. **American journal of mental deficiency**, Albany, v. 86, n. 2, p. 127–37, Oct. 1981.

COHEN, J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educational and psychological measurement**, Durham, v. 20, n. 1, p. 37–46, Apr. 1960.

COSTA, R. M. Gil da; OLIVEIRA, J. P.; SARAIVA, A. L.; SEIXAS, F.; FARIA, F.; GÄRTNER, F.; PIRES, M. A.; LOPES, C. Immunohistochemical characterization of 13 canine renal cell carcinomas. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 48, n. 2, p. 427–432, Mar. 2011.

COSTANTINI, M.; SCIALERO, S.; GIANNINI, A.; GATTESCHI, B.; RINALDI, P.; LANZANOVA, G.; BONELLI, L.; CASETTI, T.; BERTINELLI, E.; GIULIANI, O. et al. Interobserver agreement in the histologic diagnosis of colorectal polyps: the experience of the multicenter adenoma colorectal study (SMAC). **Journal of clinical epidemiology**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 209–214, Mar. 2003.

DAUENDORFFER, J. N.; BASTUJI-GARIN, S.; GUERO, S.; BROUSSE, N.; FRAITAG, S. Shrinkage of skin excision specimens: formalin fixation is not the culprit. **British Journal of Dermatology**, Nova Jérsei, v. 160, n. 4, p. 810–814, Apr. 2009.

DOW, S. W.; OLSON, P. N.; ROSYCHUK, R. A.; WITHROW, S. J. Perianal adenomas and hypertestosteronemia in a spayed bitch with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 192, n. 10, p. 1439–1441, May 1988.

DUNCAN, L. M.; BERWICK, M.; BRUIJN, J. A.; BYERS, H. R.; MIHM, M. C.; BARNHILL, R. L. Histopathologic recognition and grading of dysplastic melanocytic nevi: an interobserver agreement study. **Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 100, n. 3, p. S318–S321, Mar. 1993.

EDMONDSON, E. F.; HESS, A. M.; POWERS, B. E. Prognostic significance of histologic features in canine renal cell carcinomas: 70 nephrectomies. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 52, n. 2, p. 260–268, Mar. 2015.

ER, J. C.; SUTTON, R. H. A survey of skin neoplasms in dogs from the Brisbane region. **Australian veterinary journal**, Victoria, v. 66, n. 7, p. 225–227, July 1989.

FERNANDES, C. C.; MEDEIROS, A. A.; MAGALHÃES, G. M.; SZABÓ, M. P. J.; QUEIROZ, R. P. de; SILVA, M. V. A. da; SOARES, N. P. Frequência de neoplasias cutâneas em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos 2000 a 2010. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 2, mar. 2015.

FINNIE, J. W.; BOSTOCK, D. E. Skin neoplasia in dogs. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 55, n. 12, p. 602–604, Dec. 1979.

FONSECA-ALVES, C. E.; KOBAYASHI, P. E.; RIVERA-CALDERÓN, L. G.; LAUFER-AMORIM, R. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. **Research in veterinary science**, Londres, v. 100, p. 176–181, June 2015.

FOUCAR, E. Individuality in the specialty of surgical pathology: Self-expression or just another source of diagnostic error? **American Journal of Surgical Pathology**, Nova Iorque, v. 24, n. 11, p. 1573–6, Nov. 2000.

FOUCAR, E. Diagnostic decision-making in anatomic pathology. **American journal of clinical pathology**, Baltimore, v. 116, n. suppl_1, p. S21–S33, Dec. 2001.

FRANC, B.; SALMONIÈRE, P. D. L.; LANGE, F.; HOANG, C.; LOUVEL, A.; ROQUANCOURT, A. D.; VILDÉ, F.; HEJBLUM, G.; CHEVRET, S.; CHASTANG, C. Interobserver and intraobserver reproducibility in the histopathology of follicular thyroid carcinoma. **Human pathology**, Philadelphia, v. 34, n. 11, p. 1092–1100, Nov. 2003.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, Berlim, v. 453, n. 2, p. 123–132, 2008.

GAMA, A.; PAREDES, J.; GÄRTNER, F.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression of e-cadherin, p-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 45–53, July 2008.

GAMBA, C. O.; RODRIGUES, M. A.; GOMES, D. A.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. The relationship between e-cadherin and its transcriptional repressors in spontaneously arising canine invasive micropapillary mammary carcinoma. **Journal of comparative pathology**, v. 153, n. 4, p. 256–265, Nov. 2015.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 58, n. 8, p. 857–863, Aug. 1997.

GANGULY, A.; WOLFE, L. G. Canine perianal gland carcinoma–associated antigens defined by monoclonal antibodies. **Hybridoma**, Larchmont, v. 25, n. 1, p. 10–14, Feb. 2006.

GINN, P. E.; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Skin and appendages. In: CASWELL, J.; WILLIAMS, K.; MAXIE, M. (Ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Toronto: Elsevier Saunders, 2007. v. 1, cap. 5, p. 553–781.

GOLDSCHMIDT, M. H. **World Health Organization International Histologic Classification of Tumors of Domestic Animals. Histological Classification of Tumors of the Skin of Domestic Animals**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998.

GOLDSCHMIDT, M. H.; GOLDSCHMIDT, K. H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. Iowa: John Wiley and Sons, 2017. cap. 4, p. 88–141.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. Iowa: Blackwell, 2002. p. 45–117.

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

GRIECO, V.; PATTON, V.; ROMUSSI, S.; FINAZZI, M. Cytokeratin and vimentin expression in normal and neoplastic canine prostate. **Journal of comparative pathology**, Londres, v. 129, n. 1, p. 78–84, July 2003.

GRIFFITH, C. M.; HAY, E. D. Epithelial-mesenchymal transformation during palatal fusion: carboxyfluorescein traces cells at light and electron microscopic levels. **Development**, Cambridge, v. 116, n. 4, p. 1087–1099, Dec. 1992.

GRIMES, J. A.; MATZ, B. M.; CHRISTOPHERSON, P. W.; KOEHLER, J. W.; CAPPELLE, K. K.; HLUSKO, K. C.; SMITH, A. Agreement between cytology and histopathology for regional lymph node metastasis in dogs with melanocytic neoplasms. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 54, n. 4, p. 579–587, July 2017.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Sebaceous tumors. In: GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. (Ed.). **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Iowa: Blackwell, 2005. cap. 24, p. 641–664.

HANSEN, T. P.; FENGER, C.; KRONBORG, O. The expression of p53, ki-67 and urokinase plasminogen activator receptor in colorectal adenomas with true invasion and pseudoinvasion. **APMIS**, Copenhagen, v. 107, n. 7, p. 689–694, July 1999.

HARRIS, E. I.; LEWIN, D. N.; WANG, H. L.; LAUWERS, G. Y.; SRIVASTAVA, A.; SHYR, Y.; SHAKHTOUR, B.; REVETTA, F.; WASHINGTON, M. K. Lymphovascular invasion in colorectal cancer: an interobserver variability study. **The American journal of surgical pathology**, Nova Iorque, v. 32, n. 12, p. 1816–1821, Dec. 2008.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta anatomica**, Basel, v. 154, n. 1, p. 8–20, 1995.

HAY, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Developmental dynamics**, Nova Iorque, v. 233, n. 3, p. 706–720, July 2005.

HAYES, H. M.; WILSON, G. P. Hormone-dependent neoplasms of the canine perianal gland. **Cancer research**, Baltimore, v. 37, n. 7 Pt 1, p. 2068–2071, July 1977.

HENDRICKSON, M. Principles of classification and diagnosis in anatomic pathology and the inevitability of problem cases. In: MARCHEVSKY, A. M.; WICK, M. (Ed.). **Evidence based pathology and laboratory medicine**. Nova Iorque: Springer Science and Business Media, 2011. cap. 6, p. 95–120.

HOL, E. M.; CAPETANAKI, Y. Type III intermediate filaments desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and peripherin. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, Woodbury, v. 9, n. 12, p. a021642, Dec. 2017.

HORTA, R. d. S.; LAVALLE, G. E.; RODRIGUES, A. A. M.; PEREIRA, L. C.; CARNEIRO, R. A. Hepatoid adencarcinoma in a spayed bitch with hyperadrenocorticism-case report. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 2, Supl. 2, p. 75–79, 2011.

HORTA, R. S.; LAVALLE, G. E.; MONTEIRO, L. N.; SOUZA, M. C. C.; CASSALI, G. D.; ARAÚJO, R. B. Assessment of canine mast cell tumor mortality risk based on clinical, histologic, immunohistochemical, and molecular features. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 55, n. 2, p. 212–223, Mar. 2018.

HUNG, L. C.; PONG, V. F.; CHENG, C. R.; WONG, F. I.; CHU, R. M. An improved system for quantifying AgNOR and PCNA in canine tumors. **Anticancer Research**, Attiki, v. 20, n. 5A, p. 3273–3280, Sept. 2000.

IM, K.-S.; KIM, J.-H.; KIM, N.-H.; YU, C.-H.; HUR, T.-Y.; SUR, J.-H. Possible role of snail expression as a prognostic factor in canine mammary neoplasia. **Journal of comparative pathology**, Londres, v. 147, n. 2-3, p. 121–128, Aug. 2012.

JAKAB, C.; RUSVAI, M.; GÁLFI, P.; MÁNDOKI, M.; DEMETER, Z.; SZABÓ, Z.; KULKA, J. Expression of claudin-5 in hepatoid gland biopsies. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 276–281, June 2010.

JAKAB, C.; RUSVAI, M.; GÁLFI, P.; KULKA, J. Expression of claudin-7 molecule in canine perianal Gland Tumours. **Acta Veterinaria Brno**, v. 79, n. 1, p. 127–133, 2010.

JAKAB, C.; RUSVAI, M.; SZABÓ, Z.; SZABÁRA, Á.; KULKA, J. Expression of the claudin-4 molecule in benign and malignant canine hepatoid gland tumours. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 57, n. 4, p. 463–475, Dec. 2009.

JARDIM, J.; KOBAYASHI, P. E.; COSENTINO, P. D.; ALCARAZ, A.; LAUFER-AMORIM, R.; FONSECA-ALVES, C. E. Clinicopathological and immunohistochemical description of an intrapelvic hepatoid gland carcinoma in a 14-year-old teckel dog. **Veterinary Quarterly**, Oxfordshire, v. 38, n. 1, p. 9–13, Dec. 2018.

JASIK, A.; KOZACZYNSKI, W.; REICHERT, M. Canine skin tumours with adnexal differentiation: histopathology and immunohistochemistry. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 53, n. 2, p. 277–283, 2009.

JAVANBAKHT, J.; TAVASSOLI, A.; SASANI, F.; SABBAGH, A.; HASSAN, M. A.; SAMAKKHAH, S. A.; SHAFIEE, R.; JANI, M.; ALIMOHAMMADI, S.; SAMANI, R.; BARATI, F.; GHALEE, V. An overall assessment of circumanal gland adenoma in a terrier mix breed dog. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, Haikou, v. 3, n. 7, p. 580–583, July 2013.

KALDRYMIDOU, H.; LEONTIDES, L.; KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KARAYANNOPOULOU, M. Prevalence, distribution and factors associated with the presence and the potential for malignancy of cutaneous neoplasms in 174 dogs admitted to a clinic in northern Greece. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 87–91, Mar. 2002.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, American Society for Clinical Investigation, New Haven, v. 112, n. 12, p. 1776–1784, Dec. 2003.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of clinical investigation**, Am Soc Clin Investig, New Haven, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, June 2009.

KERNS, M. J. J.; DARST, M. A.; OLSEN, T. G.; FENSTER, M.; HALL, P.; GREVEY, S. Shrinkage of cutaneous specimens: formalin or other factors involved? **Journal of cutaneous pathology**, Malden, v. 35, n. 12, p. 1093–1096, Dec. 2008.

KHAN, M. S.; LUONG, T. V.; WATKINS, J.; TOUMPANAKIS, C.; CAPLIN, M. E.; MEYER, T. A comparison of ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. **British journal of cancer**, Londres, v. 108, n. 9, p. 1838–1845, May 2013.

KIM, K.-R.; LEE, H.-I.; LEE, S.-K.; RO, J. Y.; ROBBOY, S. J. Is stromal microinvasion in primary mucinous ovarian tumors with “mucin granuloma” true invasion? **The American journal of surgical pathology**, Nova Iorque, v. 31, n. 4, p. 546–554, Apr. 2007.

KIMURA, K. C.; GÁRATE, A. P.; DAGLI, M. L. Z. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: A survey between 1993 and 2002 of the service of animal pathology, department of pathology, school of veterinary medicine and animal science, university of sao paulo, southeast brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 5, n. 2, p. 60–69, 2012.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J.; BAILEY, K.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C.; FITZGERALD, S.; GAMBLE, D.; GINN, P.; GOLDSCHMIDT, M.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 48, n. 1, p. 147–155, Jan. 2011.

KLYMKOWSKY, M. W.; SAVAGNER, P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 174, n. 5, p. 1588–1593, May 2009.

KONDO, F. Assessment of stromal invasion for correct histological diagnosis of early hepatocellular carcinoma. **International journal of hepatology**, Nova Iorque, v. 2011, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. (Ed.). **Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book**. Philadelphia: Elsevier, 2015. cap. 7, p. 265–340.

LAENKHOLM, A.-V.; GRABAU, D.; TALMAN, M.-L. M.; BALSLEV, E.; JYLLING, A. M. B.; TABOR, T. P.; JOHANSEN, M.; BRÜGMANN, A.; LELKAITIS, G.; CATERINO, T. D. et al. An inter-observer ki67 reproducibility study applying two different assessment methods: on behalf of the danish scientific committee of pathology, danish breast cancer cooperative group (DBCG). **Acta Oncologica**, Londres, v. 57, n. 1, p. 83–89, Jan. 2018.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, Mar. 1977.

LAPIDOT, T.; SIRARD, C.; VORMOOR, J.; MURDOCH, B.; HOANG, T.; CACERES-CORTES, J.; MINDEN, M.; PATERSON, B.; CALIGIURI, M. A.; DICK, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, Basingstoke, v. 367, n. 6464, p. 645–648, Feb. 1994.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M.-F.; NET, J.-L.; LAGADIC, M.; DELVERDIER, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary dermatology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 139–147, June 2001.

LEBLEU, V. S.; TADURI, G.; O'CONNELL, J.; TENG, Y.; COOKE, V. G.; WODA, C.; SUGIMOTO, H.; KALLURI, R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. **Nature medicine**, Nova Iorque, v. 19, n. 8, p. 1047–1053, Aug. 2013.

LI, L.; HU, B.; GREENE, T. A simple method to estimate the time-dependent ROC curve under right censoring. **Statistical methods in medical research**, Londres, v. 27, n. 8, p. 2264–2278, Aug. 2015.

LIEN, W.-H.; KLEZOVITCH, O.; VASIOUKHIN, V. Cadherin–catenin proteins in vertebrate development. **Current opinion in cell biology**, Londres, v. 18, n. 5, p. 499–506, Oct. 2006.

LINDLEY, S. W.; GILLIES, E. M.; HASSELL, L. A. Communicating diagnostic uncertainty in surgical pathology reports: disparities between sender and receiver. **Pathology-Research and Practice**, Stuttgart, v. 210, n. 10, p. 628–633, Oct. 2014.

LIPOWITZ, A. J.; SCHWARTZ, A.; WILSON, G. P.; EBERT, J. W. Testicular neoplasms and concomitant clinical changes in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 163, n. 12, p. 1364–1368, Dec. 1973.

MANDARA, M. T.; REGINATO, A.; FOIANI, G.; BARONI, M.; POLI, F.; GASPARINETTI, N.; BERNARDINI, M. Papillary meningioma in the dog: A clinicopathological case series study. **Research in veterinary science**, Londres, v. 100, p. 213–219, June 2015.

MARTINS, A. M. C. R. P.; GUERRA, J. L.; OLORIS, S. C. S.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E. d.; DAGLI, M. L. Z. et al. Expression of connexins 43, 26 and 32 in normal, hyperplastic and neoplastic perianal dog glands. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 1, p. 46–51, 2010.

MARTINS, A. M. C. R. P. F.; VASQUES-PEYSER, A.; TORRES, L. N.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Retrospective – systematic study and quantitative analysis of cellular proliferation and apoptosis in normal, hyperplastic and neoplastic perianal glands in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 71–79, Jun. 2008.

MATOS, A. J. F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G. R.; GÄRTNER, F. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal of comparative pathology**, Londres, v. 134, n. 2-3, p. 182–189, Mar. 2006.

MCCLELLAND, R. B. X-radiation of perianal adenomas in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 127, n. 942, p. 249–250, Sept. 1955.

MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia medica**, Zagreb, v. 22, n. 3, p. 276–282, 2012.

MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA, E. C. d.; RODRIGUES, B. A.; COSTA, G. R. d.; SONNE, L.; TESSER, E. S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da região metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesquisa veterinária brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 11, p. 968–973, nov. 2010.

MEUTEN, D.; MUNDAY, J. S.; HAUCK, M. Time to standardize? time to validate? **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 55, n. 2, p. 195–199, Mar. 2018.

MEUTEN, D. J.; MOORE, F. M.; GEORGE, J. W. Mitotic count and the field of view area: time to standardize. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 53, n. 1, p. 7–9, Jan. 2016.

MILLS, S. W.; MUSIL, K. M.; DAVIES, J. L.; HENDRICK, S.; DUNCAN, C.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B.; PHILIBERT, H.; WOBESER, B. K.; SIMKO, E. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 52, n. 2, p. 238–249, Mar. 2015.

MISCHKE, R.; MEURER, D.; HOPPEN, H. O.; UEBERSCHÄR, S.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Blood plasma concentrations of oestradiol-17 β , testosterone and testosterone/oestradiol ratio in dogs with neoplastic and degenerative testicular diseases. **Research in veterinary science**, Londres, v. 73, n. 3, p. 267–272, Dec. 2002.

MUKARATIRWA, S.; CHIPUNZA, J.; CHITANGA, S.; CHIMONYO, M.; BHEBHE, E. Canine cutaneous neoplasms: prevalence and influence of age, sex and site on the presence and potential malignancy of cutaneous neoplasms in dogs from Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, Cape Town, v. 76, n. 2, p. 59–62, June 2005.

MULAS, J. M. D. L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; PÉREZ, J.; MOZOS, E.; ESTRADA, M.; MÉNDEZ, A. Immunohistochemical evaluation of canine primary liver carcinomas: distribution of alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, keratins and vimentin. **Research in veterinary science**, Londres, v. 59, n. 2, p. 124–127, Sept. 1995.

MULLIGAN, R. M. Epithelial neoplasms of skin and adnexae. In: MULLIGAN, R. M. (Ed.). **Neoplasms of the Dog**. Baltimore: The Williams And Wilkins Company, 1949. cap. 3, p. 31–56.

MUNSON, L.; CRAIG, L. E.; MILLER, M.; KOCK, N. D.; SIMPSON, R. M.; WELLMAN, M. L.; SHARKEY, L. C.; BIRKEBAK, T. A. Elements of good training in anatomic pathology. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 47, n. 5, p. 995–1002, Sept. 2010.

NAGAMINE, E.; HIRAYAMA, K.; MATSUDA, K.; OKAMOTO, M.; OHMACHI, T.; UCHIDA, K.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H. Invasive front grading and

epithelial-mesenchymal transition in canine oral and cutaneous squamous cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 54, n. 5, p. 783–791, Sept. 2017.

NAKANO, M.; TAURA, Y.; INOUE, M. Protein expression of Mdm2 and p53 in hyperplastic and neoplastic lesions of the canine circumanal gland. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v. 132, n. 1, p. 27–32, Jan. 2005.

NAKHLEH, R. E. **Error reduction and prevention in surgical pathology**. Flórida: Springer, 2015.

NIELSON, S.; AFTOSMIS, J. Canine perianal gland tumours. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 144, p. 127–135, Jan. 1964.

NORTHRUP, N. C.; HOWERTH, E. W.; HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; CARMICHEAL, K. P.; GARCIA, A. P.; LATIMER, K. S.; MUNDAY, J. S.; RAKICH, P. M.; RICHEY, L. J.; L, S. N.; L, G. T. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 17, n. 6, p. 561–564, Nov. 2005.

OWEN, L. N.; WHO, - World Health Organization. **TNM classification of tumours in domestic animal**. Geneva: World Health Organization, 1980.

PAKHRIN, B.; KANG, M.-S.; BAE, I.-H.; PARK, M.-S.; JEE, H.; YOU, M.-H.; KIM, J.-H.; YOON, B.-I.; CHOI, Y.-K.; KIM, D.-Y. Retrospective study of canine cutaneous tumors in korea. **Journal of Veterinary Science**, Seoul, v. 8, n. 3, p. 229–236, Sept. 2007.

PANG, L. Y.; CERVANTES-ARIAS, A.; ELSE, R. W.; ARGYLE, D. J. Canine mammary cancer stem cells are radio-and chemo-resistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. **Cancers**, Basel, v. 3, n. 2, p. 1744–1762, Mar. 2011.

PARK, D.; KÅRESEN, R.; AXCRONA, U.; NOREN, T.; SAUER, T. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, α -, β -, γ -catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. **APMIS**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 52–65, Jan. 2007.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary pathology**, v. 21, n. 5, p. 469–474, Sept. 1984.

PENA, G. P.; ANDRADE-FILHO, J. S. How does a pathologist make a diagnosis? **Archives of pathology & laboratory medicine**, Northfield, v. 133, n. 1, p. 124–132, Jan. 2009.

PEÑAFIEL-VERDU, C.; BUENDIA, A. J.; NAVARRO, J. A.; RAMIREZ, G. A.; VILAFRANCA, M.; ALTIMIRA, J.; SANCHEZ, J. Reduced expression of E-cadherin and β -catenin and high expression of basal cytokeratins in feline mammary carcinomas with regional metastasis. **Veterinary pathology**, THousand Oaks, v. 49, n. 6, p. 979–987, Nov. 2012.

PEREIRA, R. S.; SCHWEIGERT, A.; MELO, G. D. de; FERNANDES, F. V.; SUEIRO, F. A. R.; MACHADO, G. F. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC veterinary research**, LondresCentral, v. 9, n. 1, p. 83, Apr. 2013.

PERRY, J. A.; CULP, W. T. N.; DAILEY, D. D.; EICKHOFF, J. C.; KAMSTOCK, D. A.; THAMM, D. H. Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading soft tissue sarcomas in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 2, p. 106–113, 2014.

PETTERINO, C.; MARTINI, M.; CASTAGNARO, M. Immunohistochemical detection of growth hormone (GH) in canine hepatoid gland tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 569–572, May 2004.

PHAROAH, P. D. P.; GUILFORD, P.; CALDAS, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 121, n. 6, p. 1348–1353, Dec. 2001.

PIEPER, J. B.; STERN, A. W.; LECLERC, S. M.; CAMPBELL, K. L. Coordinate expression of cytokeratins 7 and 14, vimentin, and Bcl-2 in canine cutaneous epithelial tumors and cysts. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 27, n. 4, p. 497–503, July 2015.

PISANI, G.; MILLANTA, F.; LORENZI, D.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Androgen receptor expression in normal, hyperplastic and neoplastic hepatoid glands in the dog. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 231–236, Oct. 2006.

POSPISCHIL, A.; FOLKERS, G. How much reproducibility do we need in human and veterinary pathology? **Experimental and toxicologic pathology**, Munique, v. 67, n. 2, p. 77–80, Feb. 2015.

PREZIOSI, R.; SALDA, L. D.; RICCI, A.; SIMONI, P.; MARCATO, P. Quantification of nucleolar organiser regions in canine perianal gland tumours. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 277–281, May 1995.

REGAN, R. C.; RASSNICK, K. M.; BALKMAN, C. E.; BAILEY, D. B.; MCDONOUGH, S. P. Comparison of first-opinion and second-opinion histopathology from dogs and cats with cancer: 430 cases (2001–2008). **Veterinary and comparative oncology**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 1–10, Mar. 2010.

REGINATO, A.; GIROLAMI, D.; MENCHETTI, L.; FOIANI, G.; MANDARA, M. T. E-cadherin, N-cadherin expression and histologic characterization of canine choroid plexus tumors. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 53, n. 4, p. 788–791, July 2016.

RESTUCCI, B.; MARTANO, M.; VICO, G. D.; MUZIO, L. L.; MAIOLINO, P. Expression of E-cadherin, β -catenin and APC protein in canine colorectal tumours. **Anticancer research**, Attiki, v. 29, n. 8, p. 2919–2925, Aug. 2009.

RISMANCHI, S.; YADEGAR, O.; MUHAMMADNEJAD, S.; AMANPOUR, S.; TAGHIZADEH-JAHED, M.; MUHAMMADNEJAD, A. Expression of

vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: A simulation of clinicopathological features of human breast cancer. **Biomedical reports**, Londres, v. 2, n. 5, p. 725–728, Sept. 2014.

RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Nova Jérsei: John Wiley and Sons, 2018.

ROBBINS, P.; PINDER, S.; KLERK, N. D.; DAWKINS, H.; HARVEY, J.; STERRETT, G.; ELLIS, I.; ELSTON, C. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. **Human pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 8, p. 873–879, Aug. 1995.

ROBIN, X.; TURCK, N.; HAINARD, A.; TIBERTI, N.; LISACEK, F.; SANCHEZ, J.-C.; MÜLLER, M. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. **BMC bioinformatics**, Londres, v. 12, n. 1, p. 77, Mar. 2011.

ROTHWELL, T. L. W.; HOWLETT, C. R.; MIDDLETON, D. J.; GRIFFITHS, D. A.; DUFF, B. C. Skin neoplasms of dogs in sydney. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 64, n. 6, p. 161–164, June 1987.

ROY, F. V.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 65, n. 23, p. 3756–3788, Nov. 2008.

RUNGSIPAT, A.; SUNYASOOTCHAREE, B.; OUSAWAPHLANGCHAI, L.; SAILASUTA, A.; THANAWONGNUWECH, R.; TEANKUM, K. Neoplasms of dogs in Bangkok. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 33, n. 1, p. 59–66, 2003.

SALVADO, I. S. d. S. **Estudo retrospectivo das neoplasias em cães e felídeos domésticos, analisadas pelo laboratório de anatomia patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, no período compreendido entre 2000 e 2009**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

SARAIVA, A.; GÄRTNER, F.; PIRES, M. Expression of p63 normal canine skin and primary cutaneous glandular carcinomas. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 177, n. 1, p. 136–140, July 2008.

SARAIVA, A. L. d. S. S. **Contribuição para o estudo da biopatologia dos adenocarcinomas cutâneos em cães**. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2011.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; TOLLA, L. D.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Thousand Oaks, v. 16, n. 6, p. 542–547, Nov. 2004.

SCARPA, F.; SABATTINI, S.; MARCONATO, L.; CAPITANI, O.; MORINI, M.; BETTINI, G. Use of histologic margin evaluation to predict recurrence of cutaneous malignant tumors in dogs and cats after surgical excision. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 240, n. 10, p. 1181–1187, May 2012.

SCOLYER, R. A.; SHAW, H. M.; THOMPSON, J. F.; LI, L.-X. L.; COLMAN, M. H.; LO, S. K.; MCCARTHY, S. W.; PALMER, A. A.; NICOLL, K. D.; DUTTA, B. et al. Interobserver reproducibility of histopathologic prognostic variables in primary cutaneous melanomas. **The American journal of surgical pathology**, Nova Iorque, v. 27, n. 12, p. 1571–1576, Dec. 2003.

SHABADASH, S. A.; ZELIKINA, T. I. Once more about hepatoid circumanal glands of dogs; history of their discovery and causes of revision of their structure and function. **Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences**, Moscou, v. 29, n. 2, p. 139–147, 2002.

SHARIF, M. A. M. **Epidemiology of skin tumor entities according to the new WHO classification in dogs and cats**. 2006. 177 f. Tese (Doutorado) — Universitätsbibliothek Giessen, Gessen, 2006.

SHAW, T.; KUDNIG, S.; FIRESTONE, S. Diagnostic accuracy of pre-treatment biopsy for grading cutaneous mast cell tumours in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 214–219, June 2018.

SHROUT, P. E.; FLEISS, J. L. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. **Psychological bulletin**, Washington, v. 86, n. 2, p. 420–428, Mar. 1979.

SILVA, J. Um caso de adenocarcinoma das glândulas hepatóides com metastatização extensa. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Supl. 118, p. 31–32, jan. 2002.

SILVA, J.; PELETEIRO, M.; CORREIA, J. Hiperplasia e tumores das glândulas hepatóides: Estudo retrospectivo (1995 - 2001). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Supl. 118, p. 32, jan. 2002.

SIMEONOV, R.; DINEV, I.; SIMEONOVA, G.; GORANOV, N.; PASKALEV, M.; KRASDEV, S.; TODOROVA, I.; CHAPRAZOV, T.; ROIDEV, R.; BORISSOV, I.; HUBENOV, H.; DINEV, D. Prevalence of canine epithelial, melanocytic and mesenchymal tumours of the skin and soft tissues: A 10-year study. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 14, n. 3, p. 171–178, 2011.

SMYTHE, R. The treatment of certain canine neoplasms by stilboestrol. **Veterinary Record**, Londres, v. 57, n. 11, p. 5, 1945.

SMYTHE, R. Some further notes on the use of stilboestrol dipropionate in canine practice. **Veterinary Record**, Londres, v. 58, p. 75, 1946.

SOBCZYNSKA-RAK, A.; BRODZKI, A. VEGF and 17- β -estradiol levels after tamoxifen administration in canine hepatoid gland adenomas and hepatoid gland epitheliomas. **In Vivo**, Athens, v. 28, n. 5, p. 871–877, Sept. 2014.

SONTAS, H. B.; DOKUZEYLU, B.; TURNA, O.; EKICI, H. Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 50, n. 10, p. 1054–1058, Oct. 2009.

ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I.; SEVERIN, K.; HUZAK, M.; HOHŠTETER, M.; KURILJ, A. G.; ARTUKOVIĆ, B.; DŽAJA, A.; GRABAREVIĆ, Ž. Quantification of morphology of canine circumanal gland tumors: a fractal based study. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 60, n. 2, p. 2609, Apr. 2016.

ŠOŠTARIĆ-ZUCKERMANN, I.-C.; SEVERIN, K.; HOHŠTETER, M.; ARTUKOVIĆ, B.; BECK, A.; KURILJ, A. G.; SABOČANEC, R.; DŽAJA, P.; GRABAREVIĆ, Ž. et al. Incidence and types of canine tumours in croatia. **ARHIV Veterinarski Arhiv**, v. 83, n. 1, p. 31–45, 2013.

SOUZA, T. M. d. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 555–560, mar. 2006.

SPUGNINI, E.; DOTSINSKY, I.; MUDROV, N.; CARDOSI, G.; CITRO, G.; AVINO, A. D.; BALDI, A. Biphasic pulses enhance bleomycin efficacy in a spontaneous canine perianal tumors model. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, Londres, v. 26, n. 4, p. 483–487, Dec. 2007.

STOCKINGER, A.; EGER, A.; WOLF, J.; BEUG, H.; FOISNER, R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent β -catenin transcriptional activity. **The Journal of cell biology**, Nova Iorque, v. 154, n. 6, p. 1185–1196, Sept. 2001.

TARIN, D.; THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. **Cancer research**, Baltimore, v. 65, n. 14, p. 5996–6001, July 2005.

TERRY, M. B.; NEUGUT, A. I.; BOSTICK, R. M.; POTTER, J. D.; HAILE, R. W.; FENOGLIO-PREISER, C. M. Reliability in the classification of advanced colorectal adenomas. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, Philadelphia, v. 11, n. 7, p. 660–663, July 2002.

THOM, M. X-ray therapy in the treatment of anal adenomas. **The North American Veterinarian**, v. 31, p. 42–43, Jan. 1950.

THOMPSON, E. W.; NEWGREEN, D. F.; TARIN, D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? **Cancer research**, Baltimore, v. 65, n. 14, p. 5991–5995, July 2005.

TOSTES, R. A.; BRANCO, A.; CESTARI, F. K.; CALEFFO, T.; VIOTT, A. D. M. Retrospective study of canine cutaneous neoplasia. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 1, p. 71–80, 2017.

TOZON, N.; KODRE, V.; SERSA, G.; CEMAZAR, M. Effective treatment of perianal tumors in dogs with electrochemotherapy. **Anticancer research**, Attiki, v. 25, n. 2A, p. 839–845, Mar. 2005.

TOZON, N.; SERSA, G.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy: Potentiation of local antitumor effectiveness of cisplatin in dogs and cats. **Anticancer research**, Attiki, v. 21, n. 4, p. 2483–2488, July 2001.

TRELSTAD, R. L.; HAY, E. D.; REVEL, J.-P. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. **Developmental biology**, Nova Iorque, v. 16, n. 1, p. 78–106, July 1967.

TUNC, A. S.; ALCIGIR, M.; VURAL, S. et al. Concurrent metastatic hepatoid gland carcinoma and eosophagogastric leiomyosarcoma in a dog. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Ankara, v. 61, n. 1, p. 29–34, 2014.

VAIL, D.; WITHROW, S.; SCHWARZ, P.; POWERS, B. Perianal adenocarcinoma in the canine male: a retrospective study of 41 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 26, n. 3, p. 329–334, 1990.

VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Missouri: Elsevier-Saunders, 2013.

VETA, M.; DIEST, P. J. V.; JIWA, M.; AL-JANABI, S.; PLUIM, J. P. Mitosis counting in breast cancer: Object-level interobserver agreement and comparison to an automatic method. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 8, p. e0161286, Aug. 2016.

VICENTE, K.; PERALES, R.; TABACCHI, L. Frecuencia histopatológica de neoplasias perianales en caninos: casuística del laboratorio de patología veterinaria de la universidad nacional mayor de san marcos (2005-2012). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 26, n. 4, p. 719–724, 2015.

VÍCOVAC, L.; APLIN, J. D. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 156, n. 3, p. 202–216, 1996.

VIVERO, L. E de; CHAVERA, C.; PERALES, C.; FERNÁNDEZ, C. et al. Frecuencia de neoplasias caninas en lima: estudio retrospectivo en el periodo 1995-2006. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 24, n. 2, p. 182–188, 2013.

WALTER, J. A cytokeratin profile of canine epithelial skin tumours. **Journal of Comparative Pathology**, Oxford, v. 122, n. 4, p. 278–287, May 2000.

WEBSTER, J.; DENNIS, M. M.; DERVISIS, N.; HELLER, J.; BACON, N. J.; BERGMAN, P. J.; BIENZLE, D.; CASSALI, G.; CASTAGNARO, M.; CULLEN, J.; ESPLIN, D. G.; PEÑA, L.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HAHN, K. A.; HENRY, C. J.; HELLMÉN, E.; KAMSTOCK, D.; KIRPENSTEIJN, J.; KITCHELL, B. E.; AMORIM, R. L.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MCENTEE, M.; MCGILL, L. D.; MCKNIGHT, C. A.; MCMANUS, P. M.; MOORE, A. S.; MOORE, P. F.; MOROFF, S. D.; NAKAYAMA, H.; NORTHROP, N. C.; SARLI, G.; SCASE, T.; SORENMO, K.; SCHULMAN, F. Y.; SHOIEB, A. M.; SMEDLEY, R. C.; SPANGLER, W. L.; TESKE, E.; THAMM, D. H.; VALLI, V. E.; VERNAU, W.; EULER, H. von; WITHROW, S. J.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; KIUPEL, M.; AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY PATHOLOGISTS' ONCOLOGY COMMITTEE. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. **Veterinary pathology**, Thousand Oaks, v. 48, n. 1, p. 7–18, Jan. 2011.

WILSON, G.; HAYES, J. H. Castration for treatment of perianal gland neoplasms in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 174, n. 12, p. 1301–1303, Jun. 1979.

WILSON, J.; BROWN, D. Malignant perianal gland tumor with metastasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 144, p. 389–394, Feb. 1964.

WOBESER, B. K.; KIDNEY, B. A.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. J.; MAYER, M. N.; SPINATO, M. T.; ALLEN, A. L. Agreement among surgical pathologists evaluating routine histologic sections of digits amputated from cats and dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, Thousand Oaks, v. 19, n. 4, p. 439–443, July 2007.

YAP, F. W.; RASOTTO, R.; PRIESTNALL, S. L.; PARSONS, K. J.; STEWART, J. Intra- and inter-observer agreement in histological assessment of canine soft tissue sarcoma. **Veterinary and comparative oncology**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 1553–1557, Dec. 2017.

YUMUŞAK, N.; ÇALIŞKAN, M.; KUTSAL, O. Fine needle aspiration cytology (fnac) in the diagnosis of canine hepatoid gland tumors-a comparative study with histopathology. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Ankara, v. 63, n. 3, p. 259–266, 2016.

ZEISBERG, E. M.; TARNAVSKI, O.; ZEISBERG, M.; DORFMAN, A. L.; MCMULLEN, J. R.; GUSTAFSSON, E.; CHANDRAKER, A.; YUAN, X.; PU, W. T.; ROBERTS, A. B. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. **Nature medicine**, Nova Iorque, v. 13, n. 8, p. 952–961, Aug. 2007.

ZEN, Y.; ADSAY, N. V.; BARDADIN, K.; COLOMBARI, R.; FERRELL, L.; HAGA, H.; HONG, S.-M.; HYTIROGLOU, P.; KLÖPPEL, G.; LAUWERS, G. Y.; LEEUWEN, D. J. van; NOTOHARA, K.; OSHIMA, K.; QUAGLIA, A.; SASAKI, M.; SESSA, F.; SURIAWINATA, A.; TSUI, W.; ATOMI, Y.; NAKANUMA, Y. Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria. **Modern pathology**, Nova Iorque, v. 20, n. 6, p. 701, June 2007.

ZUCKMAN, M. H.; WILLIAMS, G.; LEVIN, H. S. Mitosis counting in seminoma: an exercise of questionable significance. **Human pathology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 329–335, Mar. 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Formulário de informações sobre o patologista.

INFORMAÇÕES DO PATOLOGISTA E EXPERIÊNCIA PRÉVIA:

- Identificação do patologista: ;
- Anos de experiência com patologia (desconsiderar residência em patologia): anos;
- Residência em anatomia patológica veterinária? (☐ Sim ☐ Não)
- Anos de residência: anos;
- Certificação ABPV? (☐ Sim / ☐ Não)
- Estimativa de casos de anatomia patológica veterinária já laudados: casos;
- Estimativa de casos de já laudados, considerando apenas patologia cirúrgica de pequenos animais: casos;

INFORMAÇÕES DO MICROSCÓPIO A SER UTILIZADO NA ANÁLISE:

- Aumento e número de campo de ocular: X / FN
- Aumento de objetiva de maior aumento, a ser utilizada para contagem de índice mitótico: X

APÊNDICE B: Formulário de análise histopatológica.**CASO No**

- Diagnóstico: ☐ hiperplasia / ☐ adenoma / ☐ epiteloma / ☐ carcinoma

- Infiltração:
 - ☐ bem demarcado, não encapsulado
 - ☐ bem demarcado, encapsulado
 - ☐ infiltrativo

- Grau de infiltração
 - ☐ raros focos de infiltração
 - ☐ parcialmente bem demarcado, e parcialmente infiltrativo
 - ☐ predominantemente infiltrativo
 - ☐ não se aplica

- Atipia celular:
 - ☐ sem atipia ou mínima atipia celular (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de moderada atipia
 - ☐ raros focos de intensa atipia
 - ☐ moderada atipia celular (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de mínima atipia
 - ☐ raros focos de intensa atipia
 - ☐ intensa atipia celular (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de mínima atipia
 - ☐ raros focos de moderada atipia
 - ☐ mista
 - ☐ parcialmente com mínima atipia, parcialmente com atipia moderada
 - ☐ parcialmente com mínima atipia, parcialmente com atipia intensa
 - ☐ parcialmente com moderada atipia, parcialmente com atipia intensa

- Perda de polaridade
 - ☐ polaridade preservada (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de moderada perda de polaridade
 - ☐ raros focos de marcante perda de polaridade
 - ☐ moderada perda de polaridade (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de polaridade preservada
 - ☐ raros focos de marcante perda de polaridade
 - ☐ marcante perda de polaridade (predominante)
 - ☐ difusa
 - ☐ raros focos de polaridade preservada
 - ☐ raros focos de moderada perda de polaridade
 - ☐ mista
 - ☐ polaridade parc. preservada, e parc. com moderada perda de polaridade
 - ☐ polaridade parc. preservada, e parc. com marcante perda de polaridade
 - ☐ perda moderada parc., e marcante perda parc.
- % de células de reserva em relação à população celular total:
 - ☐ 0-25%
 - ☐ 26-50%
 - ☐ 51-75%
 - ☐ 76-100%
- % de tecido tumoral demonstrando necrose:
 - ☐ 0%
 - ☐ 1-25%
 - ☐ 26-50%
 - ☐ 51-75%
 - ☐ 76-100%
- Presença de diferenciação sebácea?:
 - ☐ Não

- ☐ raros focos de diferenciação sebácea
 - ☐ diferenciação sebácea moderada a marcante
- Presença de diferenciação escamosa?:
 - ☐ Não
 - ☐ raros focos de diferenciação escamosa
 - ☐ diferenciação escamosa moderada a marcante
- Contagem de mitoses em 10 campos de maior aumento:
- Presença de mitoses atípicas? ☐ Sim / ☐ Não
- Presença de mitoses em células hepatoides diferenciadas ou parcialmente diferenciadas? ☐ Sim / ☐ Não
- Invasão vascular por células neoplásicas? ☐ Sim / ☐ Não
- Comentários adicionais:

APÊNDICE C: Questionário de seguimento clínico.

**FICHA DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DE CASOS DE
TUMORES DE GLÂNDULA HEPATOIDE.**

PROJETO DE MESTRADO – DANILO GOUVEIA WASQUES 'PROGRAMA DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL
E COMPARADA FMVZ-USP
ORIENTADOR: PROF. BRUNO COGLIATI

• CONFIRMAÇÃO DE DADOS DO PACIENTE

Data do relatório: <data do relatório>

<número de registro laboratorial do relatório>

Nome : <nome> Espécie: <espécie> Raça: <raça> Cor: <cor> Sexo: <sexo> Idade: <idade>

Prontuário: <nº de prontuário> Proprietário: <proprietário> Endereço: <endereço>

Med.Vet.Dr(a): <veterinário solicitante>

Tecido Emitido: <localização da lesão>

Os dados estão corretos?()Sim/()Não.

Listar as correções:

- _____
- _____
- _____
- ...

• INFORMAÇÕES DE ATENDIMENTO CLÍNICO INICIAL

Qual a data do atendimento clínico deste paciente, referente à queixa da lesão neoplásica em estudo? __/__/__

Tamanho do tumor (em cm): ____

No momento do diagnóstico, o animal era castrado ou inteiro?

() Castrado;

- Com que idade o animal foi castrado? _____

() Inteiro.

• INFORMAÇÕES DE EXAMES PRÉVIOS

Citologia

Foi realizado exame citológico previamente à excisão da lesão? __Sim/ __Não.

O laudo encontra-se neste laboratório? __Sim/ __Não.

Caso afirmativo, qual o número de registro? _____

Caso negativo, é possível fornecer cópia do laudo? __Sim/ __Não.

Houve concordância de diagnóstico citológico com histopatológico excisional?

__Sim/ __Não/ __Parcial(_____)

O resultado de exame citológico influenciou a conduta terapêutica? De que maneira?

• _____

Histopatologia

Foi realizada biópsia incisional diagnóstica previamente à excisão da lesão? __Sim/ __Não.

O laudo encontra-se neste laboratório? __Sim/ __Não.

Caso afirmativo, qual o número de registro? _____

Caso negativo, é possível fornecer cópia do laudo? __Sim/ __Não.

Houve concordância de diagnóstico de biópsia incisional com histopatológico excisional?

__Sim/ __Não/ __Parcial(_____)

O resultado de biópsia incisional influenciou a conduta terapêutica? De que maneira?

• _____

• INFORMAÇÕES DE TRATAMENTO

Qual terapia empregada? (assinalar pelo menos um)

() Excisão cirúrgica

() Quimioterapia

Qual protocolo utilizado? _____

() Castração

() Observação/monitoramento periódico.

Após a excisão da lesão, foi efetuada ampliação de margens? __Sim/ __Não.

Caso afirmativo, a histopatologia estava livre de células neoplásicas?

__Sim/ __Não/ __Havia células suspeitas/ __Histopatologia não realizada.

Restaram outras lesões nodulares após a excisão desta lesão

() Sim. Em que locais? _____

Foram submetidas a excisão ou tratamento posteriormente? _____

() Não.

• INFORMAÇÕES DE SEGUIMENTO DO PACIENTE

De que maneira foi realizado acompanhamento clínico/monitoramento periódico do paciente?

- ☐ Não foi realizado;
- ☐ Contato telefônico com o proprietário
- ☐ Atendimento clínico
- ☐ Exames complementares

Quais?

- _____
- _____
- _____
- ...

Com que periodicidade foi realizado o monitoramento do paciente? _____

Qual a última data em que o animal foi avaliado? _____

Houve recidiva da lesão nodular? (**INFORMAÇÃO ESSENCIAL**)

- ☐ Sim. Em que data? ____
- ☐ Não

Caso afirmativo, qual terapia empregada para a(s) recidiva(s)? (assinalar pelo menos um)

- ☐ Excisão cirúrgica
- ☐ Quimioterapia

Qual protocolo utilizado? _____

- ☐ Castração
- ☐ Observação/monitoramento periódico.

Houve metástase de lesão neoplásica? (**INFORMAÇÃO ESSENCIAL**)

- ☐ Sim. Em que data? _____
- ☐ Não.

Em caso de metástase:

Quais órgãos acometidos?

- _____
- _____
- _____

Qual método de detecção da metástase?

- ☐ Citologia aspirativa;
- ☐ Biópsia
- ☐ Exame físico
- ☐ Exame de imagem (especificar qual(is): _____)
- ☐ Outro(s): _____

Em caso de laudo (citológico/histopatológico) deste laboratório, qual o número de registro? _____

Após o diagnóstico de doença metastática, houve tentativa de tratamento do paciente?

__Sim/ __Não.

Caso afirmativo, qual tratamento instituído?:

- _____

O animal veio a óbito? __ Sim/ __ Não. **(INFORMAÇÃO ESSENCIAL)**

Caso afirmativo:

Em que data: _____

Motivo do óbito: _____

Foi eutanasiado? __ Sim/ __ Não.

Este foi o primeiro diagnóstico de tumor de glândula perianal neste paciente? __ Sim/ __ Não.
(INFORMAÇÃO ESSENCIAL)

Caso negativo:

Qual diagnóstico prévio? _____

Qual o método de diagnóstico? (Citologia, histopatologia) _____

O laudo encontra-se neste laboratório? __ Sim/ __ Não.

Caso afirmativo, qual o número de registro? _____

Caso negativo, é possível fornecer cópia do laudo? __ Sim/ __ Não.

Qual a localização da lesão? _____

Qual o tamanho da lesão no momento do diagnóstico? _____

Qual terapia empregada? (assinalar pelo menos um)

☐ Excisão cirúrgica

☐ Quimioterapia

Qual protocolo utilizado? _____

☐ Castração

☐ Observação/monitoramento periódico.

Periodicidade de monitoramento: _____

Método de monitoramento (ex.: exame físico, exames de imagens, etc)

- _____
- _____
- _____

Em caso de paciente macho, há diagnóstico prévio de neoplasia testicular? Se sim, qual(is): _____

Se possível, fornecer contato do proprietário do animal para futuro contato pelos pesquisadores:

OBS.: o modelo de questionário proposto é uma diretriz para facilitar a coleta de dados. Caso haja outras informações que julgue pertinente para o estudo, favor descrever abaixo ou em meio ao questionário:

Comentários adicionais: