



## **AValiação DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES (NORs) NA HEPATITE CRÔNICA E CIRROSE CANINAS (Nota Prévia)**

**André Luís Guimarães Franco<sup>1</sup>; Raimundo Alberto Tostes<sup>2</sup>; Osimar de Carvalho Sanches<sup>3</sup>**

**RESUMO:** O estudo avaliou a atividade proliferativa das Regiões Organizadoras de Nucléolos Argirofílicas (NORs) em amostras de fígados de cães portadores de hepatite crônica ou cirrose comparando-as com as NORs de fígados caninos normais. Foram utilizados 41 animais portadores de lesão hepática crônica, triados a partir da rotina do Serviço de Anatomia Patológica do HV/CESUMAR. O grupo controle constou de 30 amostras de fígados normais provenientes de cães necropsiados no Serviço de Anatomia Patológica do HV/CESUMAR sem evidência macroscópica de lesão hepática. As amostras foram coradas pelas técnicas de HE, PAS com ou sem diastase, Reticulina e Tricrômico de Massom e pela técnica modificada de AgNOR. As amostras foram avaliadas sob microscopia ótica, analisadas digitalmente para quantificação dos NORs e a análise comparativa entre as diferentes formas de lesão e fígados normais serão avaliados pelos métodos estatísticos de Kruskal-Wallis e pelo coeficiente r de Spearman.

**Palavras-Chave:** AgNOR; Hepatite Crônica Canina; Cirrose

### **1 INTRODUÇÃO**

O termo regiões organizadoras nucleolares ou NORs define regiões constituídas de fragmento de cromossomos em torno das quais se formam os nucléolos no final da mitose. Estas regiões correspondem a alças do DNA contendo genes responsáveis pela transcrição do RNA ribossômico, de 18s e 28s, situados no nucléolo da célula e por possuírem reatividade coma a prata, foram chamadas de AgNORs (PLOTON, 1986; NONOMURA et al., 1990; SIDDIQUI et al., 1999; SIRRI et al., 2000).

A avaliação das NORs tem sido utilizada na avaliação da proliferação celular de vários tumores caninos, tais como o adenocarcinoma prostático (SILVA E CORREIA, 2003), tumor venéreo transmissível (SANTOS et al., 1998), carcinomas mamários, mastocitoma (BOSTOCK et al., 1989) e sarcomas de partes moles (ETTINGER et al., 2006).

Na avaliação de hepatopatias crônicas em pacientes humanos a técnica do AgNOR tem sido padronizada e investigada quanto ao seu potencial como um marcador efetivo de proliferação celular (CROCKER E MCGOVERN, 1988; BORZIO et al., 1998; WAKASA et al., 1998; SIDDIQUI et al., 1999; VALENÇA Jr et al., 2001). Nos cães é controversa a existência de vinculação entre a cirrose e o desenvolvimento posterior de carcinoma hepatocelular. Contudo, as características da proliferação celular nas lesões hepáticas crônicas caninas ainda são pobremente conhecidas.

<sup>1</sup> Aluno de graduação do Curso de Medicina Veterinária – CESUMAR. Bolsista do Programa de Iniciação Científica PROBIC. [andre\\_franco\\_8@hotmail.com](mailto:andre_franco_8@hotmail.com)

<sup>2</sup> Prof. Dr. Curso de Medicina Veterinária – CESUMAR. [tostes@cesumar.br](mailto:tostes@cesumar.br)

<sup>3</sup> Prof. M.Sc. Curso de Medicina Veterinária – UNOESTE. [osimarsanches@yahoo.com.br](mailto:osimarsanches@yahoo.com.br)

Assim, a avaliação de um marcador de proliferação celular no fígado de cães portadores de doença hepática crônica é útil na medida em que estabelece a possibilidade de caracterizar o potencial de uma lesão displásica e neoplásica. Tal análise tem mostrado sucesso, conforme corroboram os trabalhos de CROCKER E MCGOVERN (1998), BUFO E FRASSANITO (1992), DEREZINI et al (1993) e BORZIO et al., (1998) que trabalharam com lesões cirróticas e neoplásicas de pacientes humanos.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar e quantificar as regiões organizadoras nucleolares em casos de doença hepática crônica canina não-neoplásica; avaliar o potencial de proliferação dos hepatócitos nestas enfermidades; estabelecer a técnica de AgNOR como um dos fatores prognósticos de progressão de doença crônica canina.

## **JUSTIFICATIVAS**

A proliferação de hepatócitos ocorre em várias situações tais como hepatites agudas e crônicas, reações hepatotóxicas e cirrose. A técnica do AgNOR pretende ser um marcador de proliferação celular, viável de ponto de vista técnico e econômico. Nas hepatites crônicas caninas, a técnica de AgNOR tem potencial para ser um fator prognóstico na avaliação da progressão da doença para uma condição displásica e/ou neoplásica.

## **METODOLOGIA**

Foram selecionados 41 casos de hepatite crônica ou cirrose em cães a partir do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HV/CESUMAR. O diagnóstico histológico em microscopia ótica foi feito mediante o uso das colorações de HE, PAS com ou sem diastase, Reticulina e Tricrômico de Massom. As amostras também foram coradas pela técnica de AgNOR. A técnica de AgNOR utilizada foi a preconizada por PLOTON et al (1986) e CROCKER et al. (1989), com modificações. Os escores de análise histológica de hepatite crônica canina foram estabelecidos de acordo com os seguintes critérios: atividade inflamatória – 0 (hepatócitos normais); 1 (infiltrado leve, necrose focal); 2 (necrose focal em numerosos sítios); 3 (necrose focal e áreas de necrose confluyente); 4 (necrose focal e áreas de necrose confluyente múltiplas ou extensas); alterações biliares – 0 (ausência de colestase); 1 (colestase canalicular discreta a moderada); 2 (colestase canalicular discreta a moderada com proliferação de células de küpffer); 3 (colestase acompanhada de proliferação ductal focal); 4 colestase acompanhada de proliferação ductal difusa e fibrose portal; presença de fibrose – 0 (arquitetura lobular normal); 1 (expansão fibrosa de espaços-porta); 2 expansão fibrosa portal com septos porta-porta); 3 (preservação apenas parcial da arquitetura lobular com septos porta-porta e porta-centro, esboço de nódulos); 4 (cirrose ou predomínio de áreas nodulares em relação aos lóbulos remanescentes). A análise quantitativa dos NORs foi feita em microscopia ótica tendo como recurso de captura das imagens uma câmera JVC<sup>®</sup> TK-1270/RGB acoplada a um microcomputador utilizando o sistema operacional Windows XP<sup>®</sup> e o software de análise digital de imagens Zeiss KS300<sup>®</sup>. Foram utilizados dez campos de grande aumento para quantificação dos NORs nos núcleos dos hepatócitos, em cada campo foram contadas dez células. Para fins de controle ainda serão utilizadas 30 amostras de fígado procedentes de cães sem histórico de lesão hepática e também sem evidência macroscópica de hepatopatia no momento da necropsia. A análise estatística (em andamento) avaliará comparativamente as NORs entre os fígados normais (FN), fígados com hepatite crônica (FHC) e fígados cirróticos (FC) de forma pareada. A análise

estatística será realizada segundo os métodos de Kruskal-Wallis e o coeficiente r de Spearman.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos casos estudados, 23 (56,1%) corresponderam a casos de cirrose e 18 (43,9%) corresponderam a hepatites crônicas. Os graus de atividade histológica e as médias de NORs correspondentes em cada caso estão expressos na tabelas 1. Conforme situa PINZANI et al. (2001), a progressão fibrogênica da doença hepática, caracterizada por lesão tecidual crônica e atividade inflamatória, representa um ponto essencial em hepatologia. O mesmo autor ressalta que o critério de fibrose prevalece sobre o critério de atividade necro-inflamatória. Em última instância, os critérios histológicos têm a pretensão de não apenas instituir o diagnóstico, mas estabelecer um prognóstico, principalmente a avaliação da fibrose. O processo da fibrogênese tem um paralelo na carcinogênese que demonstra que a instalação de uma neoplasia é um processo de múltiplas etapas (PITOT, 2001). Com efeito, a fibrogênese parece operar da mesma forma, envolvendo agentes iniciadores ou indutores, promotores, amplificadores e mantenedores. No presente estudo, as alterações fibróticas e inflamatórias coexistem tendendo claramente a levar o fígado a uma condição terminal. A quantidade de NORs observada no presente estudo está abaixo daquela observada por SIDDIQUI et al. (1999). Contudo, aponta claramente que o fígado na hepatite e na cirrose apresenta atividade proliferativa que pode estar associada a erros no genoma e que prenunciem alterações displásicas e, mais tarde, neoplásicas. A análise estatística que está em andamento deverá esclarecer a significância das alterações morfológicas observadas e da contagem de NORs entre os fígados lesados e os fígados normais.

Tabela 1. Graus de lesão hepática, média de NORs e diagnóstico morfológico em 41 casos de doença hepática crônica canina.

Caso	Registro	Atividade Inflamatória	Grau de Fibrose	Alterações Biliares	Média de NORs	Diagnóstico Morfológico
1	N65/02	3	3	3	2,4	Hepatite crônica
2	N397/01	3	4	4	2,47	Cirrose
3	P06	2	3	1	2,38	Hepatite crônica
4	N102/02	4	4	4	2,64	Cirrose
5	N396/01	4	4	4	2,51	Cirrose
6	N281/00	4	3	3	2,55	Hepatite crônica
7	N194/02	3	3	2	2,61	Hepatite crônica
8	B162/02	2	4	3	2,37	Cirrose
9	N279/91	4	4	4	2,74	Cirrose
10	B60/01	3	4	4	2,76	Cirrose
11	P57/97	0	4	0	2,56	Cirrose
12	N426/00	4	4	4	2,6	Cirrose
13	PA02/02	4	4	4	2,6	Cirrose
14	P32/97	3	3	2	2,6	Hepatite crônica
15	N135/00	2	3	1	2,47	Hepatite crônica
16	N63/01	3	4	4	2,43	Cirrose
17	N61/87	1	3	1	2,45	Hepatite crônica
18	N112/91	1	3	1	2,76	Hepatite crônica
19	P237/97	1	3	0	2,93	Hepatite crônica
20	P225/96	4	4	2	2,82	Cirrose
21	P17	2	3	1	3,05	Hepatite crônica
22	N531/99	4	3	2	2,94	Hepatite crônica
23	N100/02	4	4	4	3,21	Cirrose
24	P236/97	2	4	1	2,68	Cirrose
25	P03	2	2	1	2,81	Hepatite crônica
26	P10	2	4	4	2,71	Cirrose
27	N375/00	1	2	0	2,84	Hepatite crônica
28	P202/96	1	4	3	2,85	Cirrose
29	N333/00	2	3	1	2,83	Hepatite crônica
30	N223/01	2	4	2	2,86	Cirrose
31	N424/00	1	3	1	2,99	Hepatite crônica
32	N181/01	2	4	1	3,07	Cirrose
33	N239/01	2	4	4	3,09	Cirrose
34	N117/01	3	4	2	3,31	Cirrose
35	N287/99	3	3	1	2,77	Hepatite crônica
36	P02	3	4	1	3,38	Cirrose
37	P14	2	4	1	3,1	Cirrose
38	N226/01	1	4	1	3,08	Cirrose
39	N632/99	3	4	4	3,13	Cirrose
40	N137/00	1	3	1	3,16	Hepatite crônica
41	N768/99	1	2	0	3,12	Hepatite crônica

## REFERÊNCIAS

BORZIO, M.; TRERÈ, D., BORZIO, F.; FERRARI, A.R.; BRUNO, S.; RONCALLI, M.; COLLOREDO, G.; LEANDRO, G.; OLIVERI, F.; DERENZINI, M. Hepathocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis. *J Clin Pathol: Mol. Pathol.* 51(2): 96-101, 1998.

BOSTOCK, D.E.; CROCKER, J.; HARRIS, K.; SMITH, P. Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cells tumours. *British Journal of Cancer* 59: 915-918, 1989.

BUFO, P.; FRASSANITO, F. Hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions of the liver: evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 68(11): 707-714, 1992.

CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 158(3): 185-8, 1989.

CROCKER J.; MCGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. *J Clin Pathol* 41(10): 1044-1048, 1998.

DERENZINI, M.; TRERÈ, D.; OLIVERI, F.; DAVID, E.; COLOMBATTO, P.; BONINO, F.; BRUNETTO, M.R. Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease? *J. Clin. Pathol.* 46(8): 727-9, 1993.

ETTINGER, S.N.; SCASE, T.J.; OBERTHALER, K.T.; CRAFT, D.M.; MCKNIGHT, J.A.; LEIBMAN, N.F.; CHARNEY, S.C.; BERGMAN, P.J. Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissues sarcomas: 60 cases (1996-2002). *J. Am Vet Med Assoc.* 228(7): 1053-62, 2006.

PINZANI, M., ROMANELLI, R.G., MAGLI, S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J. Hepatol.*, 34: 764-7, 2001.

PITOT, H. C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. *Lancet*, 358: 859-60, 2001.

SANTOS, F.G.A.; GUEDES, R.M.C.; CASSALI, G.D.; MEJIA, G.E.G.; VASCONCELOS, A.C. Caracterização e quantificação de regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs) em tumor venéreo transmissível canino, genital e extragenital. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 50(6): 665-672, 1998.

SIDDIQUI, MS; SOOMRO, IN; KAYANI, N.; MUZAFFAR, S.; HASAN, SH. Assessment of nucleolar organizer regions (NORs) in proliferative conditions of the liver. *Pathol. Res. Pract.* 195: 421-426, 1999.