




Coloração de Feulgen aplicada à histomorfometria nuclear com ImageJ em subtipos de carcinoma mamário canino

Feulgen staining applied to nuclear histomorphometry with ImageJ in canine mammary carcinoma subtypes

Arthur Perillo Rodrigues*¹ , Mara Taís de Carvalho¹ , Hugo Henrique Ferreira¹ , Liliana Borges de Menezes¹ , Marina Pacheco Miguel¹ 

¹ Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil 

*autor correspondente: perilloarthur34@gmail.com

Recebido: 13 de maio de 2025. Aceito: 18 de setembro de 2025. Publicado: 28 de outubro de 2025. Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: A histomorfometria é uma ferramenta importante no diagnóstico e prognóstico do câncer de mama, permitindo a quantificação de características microscópicas relacionadas à agressividade tumoral. Este estudo teve como objetivo padronizar a coloração de Feulgen para análise morfométrica nuclear e comparar as medidas nucleares obtidas entre subtipos de carcinoma mamário canino. Lâminas histológicas com cortes em microarranjos teciduais (TMA) dos diagnósticos de carcinoma tubulopapilar (CTP), carcinoma complexo (CC) e carcinoma sólido (CS) foram coradas pelo método de Feulgen. Cinco campos aleatórios por amostra de TMA foram fotografados em aumento de 400×, e a morfometria nuclear foi realizada no software ImageJ, utilizando a ferramenta *Threshold*. O subtipo CS apresentou área nuclear ($85,40 \mu\text{m}^2 \pm 0,3159$) e perímetro nuclear ($48,33 \mu\text{m} \pm 0,1217$) significativamente maiores em comparação aos subtipos CTP e CC ($P < 0,0001$). Esses resultados indicam que o CS, neoplasia de alto grau de malignidade, apresenta maiores dimensões nucleares. A área e o perímetro mostraram-se parâmetros mais confiáveis para a comparação entre diferentes subtipos, enquanto a circularidade auxiliou na diferenciação dos graus de malignidade dentro de um mesmo subtipo. A coloração de Feulgen demonstrou elevada eficiência para a histomorfometria nuclear, permitindo a delimitação precisa dos núcleos e reduzindo a subjetividade na avaliação quantitativa.

Palavras-chave: Cão; coloração histoquímica; grau de malignidade; neoplasia; morfometria nuclear.

Abstract: Histomorphometry is an important tool in the diagnosis and prognosis of breast cancer, enabling the quantification of microscopic features related to tumor aggressiveness. This study aimed to standardize the Feulgen staining method for nuclear morphometric analysis and to compare nuclear measurements among different subtypes of canine mammary carcinoma. Histological slides with tissue microarray (TMA) sections from tubulopapillary carcinoma (TPC), complex carcinoma (CC), and solid carcinoma (SC) diagnoses were stained using the Feulgen method. Five random fields per TMA sample were photographed at 400× magnification, and nuclear morphometry was performed using ImageJ software with the *Threshold* tool. The SC subtype showed significantly larger nuclear area ($85.40 \mu\text{m}^2 \pm 0.3159$) and nuclear perimeter ($48.33 \mu\text{m} \pm 0.1217$) compared to the TPC and CC subtypes ($P < 0.0001$). These results indicate that SC, a high-grade malignant neoplasm, presents greater nuclear dimensions. Nuclear area and perimeter proved to

be more reliable parameters for comparisons between different subtypes, while circularity was useful in differentiating malignancy grades within the same subtype. Feulgen staining demonstrated high efficiency for nuclear histomorphometry, allowing precise nuclear delimitation and reducing subjectivity in quantitative evaluation.

Keywords: dog; histochemical staining; malignancy grade; neoplasm; nuclear morphometry.

1. Introdução

Os tumores mamários estão entre as neoplasias mais frequentes em cadelas, particularmente nas não castradas, e aproximadamente metade dessas lesões é maligna ⁽¹⁾. Devido à sua alta incidência e similaridades biológicas com o câncer de mama humano, esses tumores representam um modelo valioso para estudos pré-clínicos espontâneos. Histologicamente, as neoplasias mamárias malignas exibem células com núcleos aumentados e nucléolos proeminentes, frequentemente acompanhados por pleomorfismo nuclear acentuado, dobramento e sobreposição nuclear, bem como agregados de cromatina grosseiros ⁽²⁾. A avaliação nuclear é, portanto, um dos critérios mais relevantes no diagnóstico tumoral, juntamente com o tipo histológico, índice mitótico, necrose, invasão peritumoral e linfática, e metástase em linfonodos regionais ⁽³⁾.

O diagnóstico histopatológico de rotina emprega a coloração por hematoxilina e eosina (H&E), que proporciona contraste entre as estruturas nucleares e citoplasmáticas de acordo com suas propriedades físico-químicas ⁽⁴⁾. A coloração H&E colore a maioria das organelas celulares e componentes da matriz extracelular em tons eosinofílicos, enquanto o núcleo, o retículo endoplasmático rugoso e os ribossomos aparecem basofílicos ⁽⁵⁾. A coloração histoquímica permite a avaliação subjetiva do pleomorfismo celular para o estadiamento da malignidade no câncer.

A avaliação morfométrica das alterações celulares e nucleares é importante para avaliar a progressão tumoral. Medidas quantitativas do perfil, tamanho e forma nuclear são frequentemente correlacionadas com a malignidade ⁽⁶⁾. Em carcinomas mamários caninos, as lesões metastáticas em linfonodos regionais têm sido associadas a uma área nuclear média significativamente maior em comparação com tumores não metastáticos ⁽⁷⁾, indicando que a morfometria nuclear pode fornecer informações prognósticas úteis. No entanto, para uma análise morfométrica nuclear precisa, são preferidos métodos de coloração específicos para DNA. A reação de Feulgen é uma técnica histoquímica específica e sensível para DNA ⁽⁸⁾, permitindo a visualização e medição detalhada das estruturas nucleares ⁽⁹⁾.

Considerando que a avaliação qualitativa das características nucleares está sujeita à variabilidade interobservador, a morfometria nuclear quantitativa pode proporcionar maior objetividade no estadiamento histológico de neoplasias caninas e apoiar o diagnóstico oncológico de rotina. Portanto, o presente estudo padronizou a coloração de Feulgen para análise morfométrica nuclear e comparou as medições nucleares entre diferentes subtipos de carcinoma mamário canino.

2. Material e métodos

2.1 Aspectos éticos e seleção de amostras

Toda a análise experimental foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o protocolo número 016/18. Um total de 300 blocos de parafina contendo fragmentos de tumores mamários caninos foi selecionado a partir do serviço privado de diagnóstico histopatológico veterinário, obtidos em clínicas

veterinárias entre 2015 e 2018. Os blocos vieram de amostras fixadas em formaldeído tamponado a 10 % e submetidas a processamento histológico de rotina em até 48 horas após o recebimento. O processamento foi realizado de acordo com uma técnica histológica de rotina para inclusão em parafina (desidratação, diafanização, impregnação e inclusão em parafina). Desses blocos, novas lâminas histológicas foram confeccionadas com cortes de 4 µm de espessura, as quais foram coradas com H&E, de acordo com o protocolo laboratorial de rotina descrito abaixo.

Como critério de inclusão, consideramos o estado de conservação dos blocos (sem rachaduras, fragmentos com boa inclusão em parafina). Para exclusão, blocos que apresentavam dúvidas diagnósticas na avaliação das lâminas não foram incluídos.

2.2 Diagnóstico histológico e classificação dos carcinomas mamários

Foram analisados 99 casos com os seguintes diagnósticos histomorfológicos: 66 carcinomas tubulopapilares (CTP), 14 carcinomas complexos (CC) e 19 carcinomas sólidos (CS). A classificação histológica e o grau de malignidade das neoplasias mamárias foram realizados por um patologista veterinário experiente. A classificação das neoplasias mamárias caninas foi estabelecida de acordo com a proposta de Elston e Ellis ⁽¹⁰⁾ e atualizada por Cassali ⁽¹¹⁾.

O grau de malignidade histológica consistiu na avaliação da formação tubular, contagem mitótica e pleomorfismo nuclear, sendo atribuído a cada parâmetro um escore numérico I, II e III ^(3, 11). A soma destes determinou a graduação da neoplasia ⁽³⁾. Cada lâmina foi analisada utilizando um microscópio de luz, utilizando 5 campos para avaliar a formação tubular e o pleomorfismo nuclear e 10 campos para a contagem mitótica para a determinação do grau histológico. Após a definição do diagnóstico histomorfológico e do grau histológico, os blocos foram confeccionados utilizando a técnica de matriz tecidual (TMA) e corados com Feulgen.

2.2.1 Desenho experimental

O estudo é observacional, transversal e metodológico, buscando avaliar a coloração de Feulgen como uma ferramenta para medição nuclear. Além disso, serão descritas e posteriormente comparadas as medições morfométricas entre diferentes classificações e graus de malignidade.

2.3 Técnica de matriz tecidual (TMA)

Blocos TMA foram preparados para cada tipo histomorfológico de carcinoma mamário canino. Esta técnica ⁽¹²⁾ consistiu na remoção de cilindros de tecido de 0,5 a 2 mm dos blocos de parafina doadores, que foram transferidos para um bloco de parafina vazio (bloco receptor). Cada bloco receptor recebeu 50 cilindros de amostras diferentes do mesmo tipo histomorfológico. Utilizamos tecido renal para a localização de cada caso de acordo com o mapa. A TMA permitiu analisar um número maior de amostras por lâmina de forma otimizada e padronizada, com redução do tempo de processamento gasto na coloração e análise.

2.4 Coloração de Feulgen e morfometria nuclear

As lâminas dos TMAs foram submetidas à coloração utilizando a técnica de Feulgen adaptada. Primeiro, as lâminas foram desparafinadas por 15 minutos a 60°C e depois lavadas em três banhos de xileno. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à seguinte rotina: submersão por 15 minutos em solução de HCl 5 mol/L, lavagem em água corrente e colocação em solução contendo reagente de

Schiff por 15 minutos em câmara escura. As lâminas foram então enxaguadas duas vezes sob água em temperatura ambiente por 5 minutos cada. Posteriormente, passaram pelos processos de desidratação, diafanização e montagem da lâmina.

2.5 Histomorfometria Nuclear

As lâminas coradas com Feulgen foram analisadas sob microscópio de luz, e cinco campos aleatórios foram capturados usando uma câmera digital acoplada ao microscópio (Leica® DMC 2900) em aumento de 400×. Posteriormente, a avaliação nuclear foi realizada usando o software ImageJ 1.52a (National Institute of Health, EUA), com aproximadamente 50 núcleos por campo ⁽¹³⁾. Os parâmetros utilizados para a morfometria nuclear foram: Área (a região abrangida dentro do perímetro nuclear); Perímetro (o comprimento total do contorno nuclear); Circularidade ($4\pi \times \text{Área} / \text{Perímetro}^2$ - descreve o grau em que o núcleo se aproxima de um círculo perfeito, com valores próximos a 1,0 indicando circularidade); e Diâmetro de Feret (a distância média entre duas linhas paralelas tangentes ao perfil nuclear, representando o diâmetro máximo do paquímetro).

As fotomicrografias foram analisadas convertendo pixels em micrômetros com calibração para uma lente objetiva de 40×. Todas as fotomicrografias foram submetidas a ajuste automático de brilho. Em seguida, foi escolhido o canal de cor verde (com a função de divisão de canais), e um limite (*threshold*) foi aplicado (Figura 1) para obter a imagem binária convertida em escala de cinza (núcleos corados de preto e o restante da imagem em branco). Depois, para delimitar a área a ser medida, a função *watershed* (separação de partículas) foi aplicada à imagem binária. Em seguida, para excluir partículas que não eram representativas de núcleos neoplásicos, um intervalo de tamanho de 40–170 μm^2 foi predefinido na função "analisar partícula".

A escolha do intervalo de análise nuclear baseou-se em resultados publicados anteriormente. Excluímos valores abaixo de 40,0 μm^2 para que os núcleos neoplásicos não fossem confundidos com células de defesa com uma área nuclear média de 31,9 μm^2 ⁽¹⁴⁾. Além disso, o estudo de Simeonov ⁽¹⁵⁾ relatou áreas nucleares médias em carcinomas mamários caninos variando de 66,83 μm^2 a 143,71 μm^2 . Esses dados nos permitiram estabelecer o intervalo de tamanho de núcleos que seriam analisados e considerados neoplásicos.

Além da medição, foram analisados núcleos de células epiteliais neoplásicas com nucléolos evidentes e cromatina grosseiramente condensada. Núcleos de células estromais, núcleos de células de defesa e áreas necróticas não foram avaliados. Células sobrepostas ou células com morfologia distorcida também foram excluídas das análises.

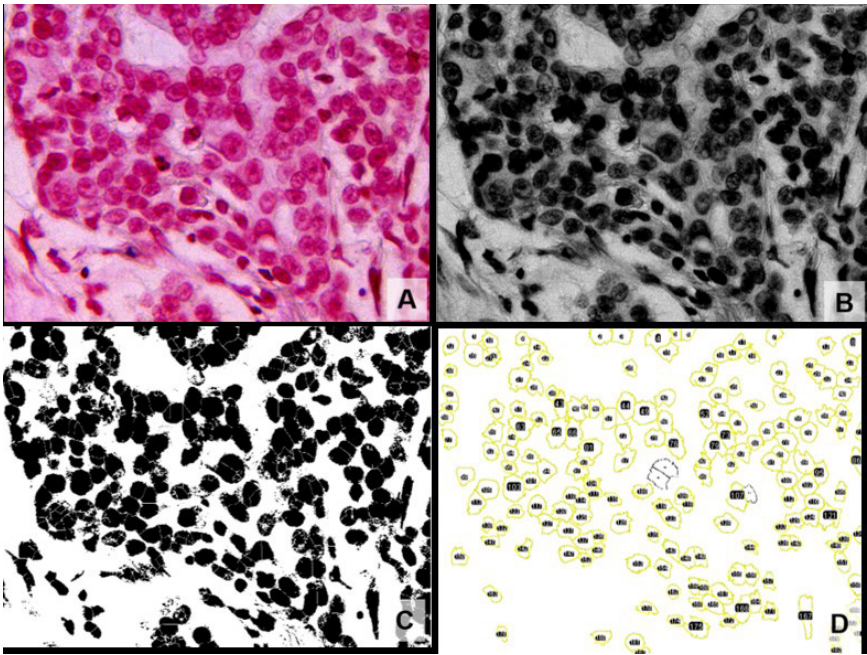


Figura 1. Etapas da análise morfométrica usando o Image J - fotomicrografia de Carcinoma Tubular, grau II, corado com Feulgen (aumento 400×). (A) Aquisição da imagem pelo software com correção de brilho. (B) Escolha da imagem com o canal de cor verde (função *Split channels*). (C) Imagem após ajuste do limite (*threshold*) e aplicação do processo de separação de partículas (*watershed*). (D) Partículas a serem medidas após a função “analisar partículas” (*analyze particles*) com um intervalo de seleção no tamanho da partícula de 40–170, a fim de eliminar núcleos de células de defesa (31,9 µm²).

2.6 Análise Estatística

Os dados das medições nucleares da coloração de Feulgen foram apresentados como média e desvio-padrão por tipo de classificação e grau de malignidade das neoplasias estudadas. Foi realizado um teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram utilizados o teste ANOVA e o pós-teste de Tukey para analisar as três classificações de carcinoma. O teste t de Student foi utilizado para analisar diferentes graus de malignidade dentro da mesma classificação de carcinoma.

3. Resultados

O número total de casos analisados por classificação histomorfológica e grau de malignidade é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação Histológica Total e Grau de Malignidade de Tumores Mamários Caninos

Classificação histológica	Grau de Malignidade I	Grau de Malignidade II	Grau de Malignidade III	Total
Carcinoma Tubulopapilar	55	11	0	66
Carcinoma Complexo	14	0	0	14
Carcinoma Sólido	0	10	9	19

A coloração de Feulgen corou fortemente o DNA em magenta, garantindo a identificação e delimitação precisas dos núcleos celulares em comparação com a coloração H&E. Os outros componentes celulares apresentaram coloração eosinofílica clara ou não foram corados (Figura A2, B2, C2). Entre os tipos de carcinomas avaliados, o CS e o CC apresentaram maior densidade nuclear e maior pleomorfismo em comparação com o CTP (Figura 2).

Os núcleos do CTP apresentaram pleomorfismo moderado a acentuado, organizados em duas ou mais fileiras de células epiteliais que formavam um aspecto tubular. A cromatina era hipercromática e desorganizada, e os nucléolos estavam dispostos principalmente na periferia nuclear. As células epiteliais e mioepiteliais do CC estavam organizadas em túbulos ou feixes irregulares, com núcleos centrais variando de formas redondas a ovais, com cromatina pontilhada e pequenos nucléolos centrais. Nas amostras de CS, os núcleos apresentaram pleomorfismo nuclear acentuado e estavam distribuídos em fileiras ou cordões sólidos e hipercromáticos sem um padrão uniforme, com cromatina desorganizada e nucléolos predominantemente na periferia nuclear (Figura 2).

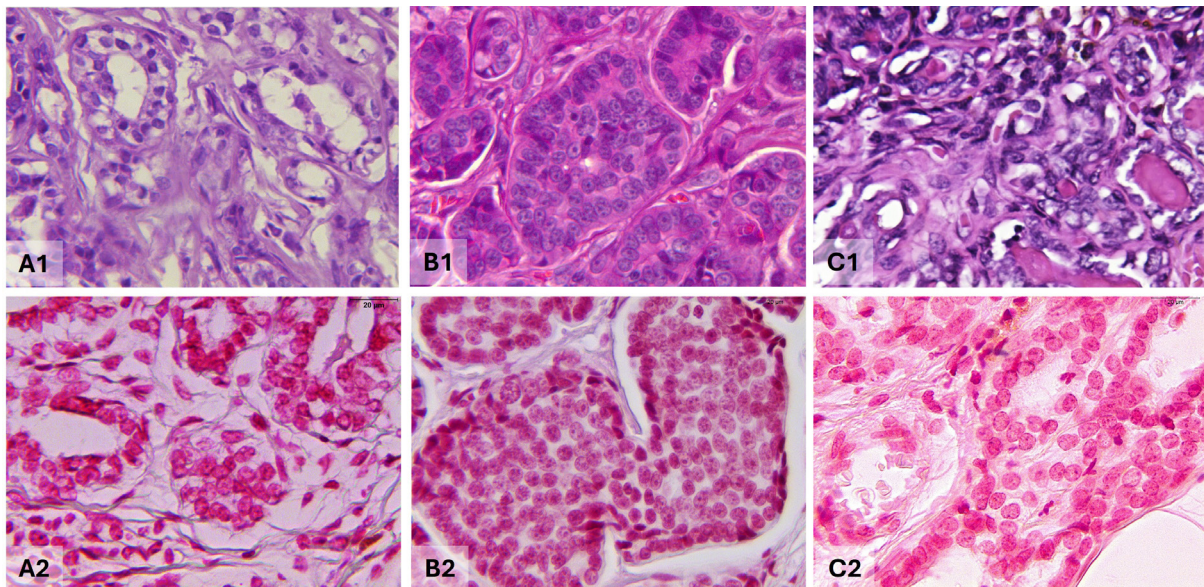


Figura 2. Fotomicrografias de tumores mamários caninos. (A1) Carcinoma Tubulopapilar (hematoxilina e eosina, HE): células neoplásicas dispostas em túbulos formando estruturas papilares, com evidente pleomorfismo nuclear. (A2) Carcinoma Tubulopapilar (Feulgen): núcleos malignos corados em magenta. (B1) Carcinoma Sólido (HE): cordões de células formando lençóis ou lóbulos sólidos, com núcleos pleomórficos mostrando pontilhamento de cromatina. (B2) Carcinoma Sólido (Feulgen). (C1) Carcinoma Complexo (HE): células desorganizadas sem limites claros, com núcleos pleomórficos e pontilhamento de cromatina. (C2) Carcinoma Complexo (Feulgen). Com a coloração de Feulgen, os núcleos são nitidamente distinguidos do fundo não corado, facilitando a análise morfométrica. Aumento $\times 400$.

Um total de 25.180 núcleos foi analisado (8.878 CTP, 8.604 CS e 7.698 CC). O CS teve maior área e perímetro nuclear (Tabela 2), quando comparado ao CC e CTP. O valor de Feret foi maior para o CTP do que para o CC, mas nenhum dos dois mostrou diferença em relação ao CS. Além disso, a circularidade nas células de CC foi significativamente maior do que nas outras.

Tabela 2. Média, Desvio-Padrão e Valor p da Área Nuclear, Perímetro Nuclear, Feret e Circularidade de Tumores Mamários Caninos

Diagnóstico		(p)
Area μm^2 (média \pm desvio padrao)		
Carcinoma Tubulopapilar	77.00 \pm 0.314 ^a	< 0.0001
Carcinoma Complexo	80.75 \pm 0.365 ^b	
Carcinoma Solido	85.40 \pm 0.316 ^c	
Perímetro nuclear μm^2 (média \pm desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	45.13 \pm 0.123 ^a	< 0.0001
Carcinoma Complexo	47.39 \pm 0.138 ^b	
Carcinoma Solido	48.33 \pm 0.122 ^c	
Perímetro nuclear μm^2 (média \pm desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	< 0.0001	0.0125
Carcinoma Complexo	13.69 \pm 0.096 ^a	
Carcinoma Solido	13.44 \pm 0.031 ^b	
Carcinoma Solido	13.50 \pm 0.026 ^{ab}	
Perímetro nuclear μm^2 (média \pm desvio padrão)		
Carcinoma Tubulopapilar	< 0.0001	< 0.0001
Carcinoma Complexo	0.113 \pm 0.002 ^a	
Carcinoma Solido	0.464 \pm 0.001 ^b	
Carcinoma Solido	0.236 \pm 0.003 ^c	

Média, desvio-padrão e valor p da área nuclear, perímetro nuclear, Feret e circularidade de tumores mamários caninos: a, b, c nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos pelo teste ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5 % (p<0,05).

Entre os graus de malignidade (Tabela 3), o CTP grau I teve menor área, perímetro e circularidade, em comparação com o CTP grau II. O valor de Feret foi maior no grau I do que no grau II. Entre os graus de malignidade no CS, uma maior área, perímetro e Feret foram observados para o grau II quando comparado ao grau III, sendo a circularidade o único parâmetro maior para o CS grau III. A análise do grau de malignidade não foi possível para o CC, pois todas as amostras eram grau I.

Tabela 3. Média, Desvio-Padrão e Valor p da Área Nuclear, Perímetro Nuclear, Feret e Circularidade de Tumores Mamários Caninos de Acordo com o Grau de Malignidade.

Diagnóstico (p)	Grau histológico (média ± desvio padrão)	
Area, µm²		
Carcinoma Tubulopapilar (p= 0.0001)	Grau I (67.34 ± 0.41)	Grau II (82.85 ± 0.42)
Carcinoma Sólido (p=0.0121)	Grau II (88.39 ± 0.68)	Grau III (86.36 ± 0.47)
Carcinoma Complexo	Grau I (80.75± 0,37)	---
Perímetro nuclear, µm²		
Carcinoma Tubulopapilar (p= 0.0001)	Grau I (41.44 ± 0.18)	Grau II (47.21 ± 0.16)
Carcinoma Sólido (p=0.0001)	Grau II (49.37 ± 0.28)	Grau III (48.02 ± 0.14)
Carcinoma Complexo	Grau I (47.39 ± 0.14)	---
Feret, µm²		
Carcinoma Tubulopapilar (p=0.0069)	Grau I (14.02 ± 0.25)	Grau II (13.49 ± 0.04)
Carcinoma Sólido (p=0.0006)	Grau II (13.66 ± 0.05)	Grau III (13.45 ± 0.03)
Carcinoma Complexo	Grau I (13.44 ± 0.03)	---
Circularidade, µm²		
Carcinoma Tubulopapilar (p=0.0001)	Grau I (0.015 ± 0.002)	Grau II (0.017 ± 0.002)
Carcinoma Sólido (p=0.0001)	Grau II (0.149 ± 0.005)	Grau III (0.155 ± 0.004)
Carcinoma Complexo	Grau I (0.464 ± 0.001)	---

Nível de significância de 5 % (p < 0,05) indica diferença estatística entre os grupos, utilizando o teste t.

4. Discussão

O presente estudo demonstrou a aplicabilidade da coloração de Feulgen para análise morfométrica nuclear em carcinomas mamários caninos utilizando um programa de computador de código aberto – ImageJ. Destexhe *et al.* ⁽¹⁶⁾ também aplicaram a coloração de Feulgen a tumores mamários caninos, utilizando preparações citocentrifugadas de núcleos corados para avaliar a ploidia, a fração de fase S e a área nuclear em lesões benignas e malignas. O estudo mostrou que a área de superfície nuclear média foi significativamente menor em lesões malignas (7.062 μm^2) em comparação com as benignas (7.745 μm^2 ; $p < 0,05$).

Embora nosso estudo não tenha incluído a análise de lesões benignas, os valores obtidos para lesões malignas ⁽¹⁶⁾ foram próximos aos descritos para o carcinoma tubulopapilar. Esses achados reforçam o potencial da morfometria nuclear como uma ferramenta complementar no diagnóstico e prognóstico de neoplasias mamárias, ao mesmo tempo que destacam a necessidade de estudos futuros que abranjam diferentes subtipos histológicos, incluindo lesões benignas, para melhor elucidar os padrões morfométricos associados à progressão tumoral.

O conteúdo de DNA nuclear pode ser determinado por análise de citometria de imagem (citometria estática), que pode ser realizada pela análise de imagens de secções de parafina coradas com Feulgen, permitindo a visualização direta das células analisadas e a análise simultânea das características morfológicas quando a citometria de fluxo não é possível ⁽¹⁷⁾. A reação de Feulgen consiste em duas etapas: a primeira é a hidrólise ácida, geralmente realizada com uma solução de HCl. A segunda etapa consiste em tratar o fragmento com o reagente de Schiff, um leucoderivado da fucsina básica ⁽⁸⁾. Vários estudos relataram o uso da coloração de Feulgen e sua utilidade em estudos de morfometria nuclear ⁽¹⁸⁻²¹⁾. Este método histoquímico simples, barato e confiável permite a análise nuclear de células cancerosas, e os parâmetros avaliados podem auxiliar no diagnóstico de neoplasias mamárias caninas.

A morfometria nuclear foi introduzida pela primeira vez em humanos como um parâmetro prognóstico em adenocarcinomas prostáticos em 1982 ⁽²²⁾, estabelecendo seu papel na pesquisa oncológica. Desde então, os avanços nas tecnologias de análise de bioimagens aumentaram significativamente a precisão e a reprodutibilidade da avaliação nuclear. Os sistemas de análise de imagem são particularmente valiosos quando a precisão quantitativa é necessária, pois reduzem a variabilidade dependente do observador e permitem a aquisição padronizada de dados. No campo biomédico, o software de bioimagem tornou-se indispensável, permitindo a extração de informações diagnóstica e prognosticamente relevantes de fotomicrografias de maneira econômica ⁽²³⁾.

Entre as plataformas mais utilizadas está o ImageJ ⁽²⁴⁾, desenvolvido pelo National Institutes of Health (NIH), que ganhou destaque não apenas pela sua acessibilidade, mas também pela sua natureza de código aberto, fomentando a inovação impulsionada pela comunidade através do desenvolvimento de *plug-ins*. Apesar dessas vantagens, persistem desafios em relação à padronização de protocolos analíticos, à integração de dados morfométricos com resultados clínicos e à interpretação dos resultados em diversos tipos de tumores.

Em estudos multicêntricos de neoplasias mamárias caninas, o carcinoma tubulopapilar simples foi relatado como o tipo maligno mais frequente (256 de 999 casos, aproximadamente 25,6 %) ⁽²⁵⁾. Um estudo retrospectivo identificou este subtipo histológico em 15,7 % dos tumores analisados ⁽²⁶⁾, enquanto dados epidemiológicos das Ilhas Canárias relataram frequências variando de 24,7 % a 29,7 % em diferentes períodos de tempo ⁽²⁷⁾, o que também evidenciamos em nosso estudo.

Os resultados do presente estudo demonstram que os parâmetros de área e perímetro nuclear são mais altos no CS do que no CTP ou CC. Em um estudo com objetivos e resultados semelhantes, mas realizado com células obtidas por biópsia por aspiração com agulha fina, coradas com Hemacolor e analisadas por Image Pro Plus, uma área nuclear média para CTP foi encontrada em $89,70 \mu\text{m}^2 (\pm 15,02)$ e para CS em $111,11 \mu\text{m}^2 (\pm 28,38)$. O valor médio do perímetro para CTP foi de $34,47 \mu\text{m}^2 (\pm 4,27)$ e para CS foi de $38,62 \mu\text{m}^2 (\pm 6,03)$ ⁽¹⁵⁾, semelhante ao presente estudo. Esses achados demonstram que esses parâmetros são mais altos em lesões malignas, como resultado de uma maior atividade biológica nuclear e acúmulo de material genético anormal durante a carcinogênese ⁽²⁸⁾.

Entre os tipos de câncer de mama canino, o CS tem um comportamento biológico mais agressivo em comparação com o CTP e o CC ⁽²⁹⁾, e as alterações nucleares poderiam ser esperadas como mais evidentes em tipos agressivos, o que corresponde aos achados deste estudo. Resultados semelhantes em um estudo comparativo ⁽³⁰⁾ da citologia de neoplasias benignas e malignas da mama em mulheres, com as neoplasias malignas apresentando valores mais altos para a área nuclear. A morfometria nuclear também foi utilizada em um estudo de câncer de próstata em cães, que mostrou que os núcleos das células neoplásicas eram maiores, com maior variação no tamanho e forma nuclear em comparação com células normais e hiperplásicas ⁽³¹⁾.

O parâmetro utilizado como fator de forma neste estudo foi a circularidade, que demonstrou que as células de CC têm núcleos com formas mais próximas a um círculo quando comparadas às de CS e CTP. Neste estudo, o parâmetro de Feret, que é utilizado para medir o diâmetro de uma partícula com margens irregulares, demonstrou que os núcleos de CC eram menores do que os de CTP. Estas duas medidas indicam o grau de anisocariose ⁽¹⁸⁾, variação no tamanho dos núcleos celulares entre células do mesmo tipo. No presente estudo, verificou-se que no CC os núcleos são mais arredondados e com menos irregularidades em comparação com os outros subtipos. Em um estudo em humanos, avaliando carcinomas renais não metastáticos, a forma nuclear foi descrita como o fator mais importante na previsão da recorrência neoplásica, e tumores compostos por núcleos mais arredondados tiveram um pior prognóstico ⁽³²⁾.

No entanto, em outro estudo com osteossarcomas, os autores relataram que pacientes com núcleos tumorais grandes e redondos tiveram um prognóstico melhor do que pacientes com núcleos pequenos e polimórficos ⁽³³⁾. Considerando os achados do presente estudo, o CC apresentou núcleos mais arredondados, e entre os subtipos tumorais analisados não é o tipo de tumor mais agressivo e nem com o pior prognóstico para pacientes relatado na literatura ^(1, 14). Portanto, os parâmetros nucleares são específicos para cada tipo de tumor e devem ser usados com cautela para definir o prognóstico e requerem mais estudos para otimizar seu uso.

Em relação aos graus histológicos, o CTP apresentou valores médios mais baixos para área, perímetro e circularidade no grau I do que no grau II, o que corresponde a um aumento no tamanho nuclear e ao acúmulo de material genético anormal em cânceres com um grau de malignidade mais alto ⁽²⁸⁾. No CS, a área, o perímetro e o Feret foram mais altos no grau II do que no grau III, e apenas a circularidade foi menor no grau III. Nossos achados em relação à circularidade foram semelhantes aos de outro estudo que mostrou que núcleos tumorais grandes e redondos tiveram um prognóstico melhor do que pacientes com núcleos pequenos e polimórficos ^(1, 3). Assim, a circularidade parece ser um bom critério para avaliação morfométrica, para indicar um maior grau de malignidade. No entanto, mais estudos associados a informações clínicas auxiliariam na compreensão dos resultados do presente estudo.

O método de Feulgen, quando combinado com abordagens baseadas em microscopia, permite a comparação de dados histomorfológicos, possibilitando a detecção específica de variações no conteúdo e intensidade de DNA entre os núcleos⁽³⁴⁾. O uso de ferramentas computacionais como o ImageJ, que podem analisar e quantificar estruturas nucleares, é essencial para reduzir a subjetividade inerente às avaliações qualitativas. Portanto, argumentamos que o estadiamento de lesões e a avaliação de tumores benignos e malignos devem depender cada vez mais de metodologias que apoiem os patologistas na minimização da subjetividade diagnóstica.

Apesar dos avanços, persistem desafios na padronização de protocolos, harmonização de abordagens analíticas e tradução da morfometria nuclear para os fluxos de trabalho clínicos de rotina. No entanto, as perspectivas futuras são promissoras. Espera-se que a integração da análise de bioimagens com a inteligência artificial e o *deep learning* supere as limitações atuais, permitindo a detecção automatizada de variações morfométricas sutis e a modelagem preditiva do comportamento tumoral. Além disso, a incorporação da morfometria nuclear e da quantificação de DNA baseada em Feulgen dentro do quadro mais amplo da patologia digital pode facilitar a melhoria da reprodutibilidade e acelerar a validação de biomarcadores de imagem quantitativos (34). Coletivamente, esses desenvolvimentos sugerem que a morfometria nuclear, apoiada pela coloração de Feulgen e ferramentas computacionais avançadas, passará de uma metodologia de apoio a um componente central dos estudos de morfometria nuclear em patologia.

5. Conclusão

A coloração de Feulgen possibilitou a análise morfométrica precisa e confiável dos núcleos de carcinoma mamário canino quando combinada com a ferramenta de análise ImageJ. Carcinomas com um grau de malignidade mais alto apresentaram maiores parâmetros morfométricos nucleares, particularmente área e perímetro nuclear. Essas medições foram mais precisas para diferenciar os tipos de carcinoma, enquanto a circularidade nuclear foi melhor para avaliar os graus de malignidade. Embora os resultados demonstrem distinções morfométricas entre os tipos de carcinoma e os graus de malignidade, é necessária uma investigação adicional. Sugerem-se estudos que incluam um número maior de casos e uma avaliação sistemática de outras lesões malignas e benignas para expandir essas observações e fornecer uma compreensão mais abrangente da variação morfométrica nuclear em todo o espectro de lesões mamárias caninas.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declararam não haver potenciais conflitos de interesse em relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão disponibilizados mediante solicitação.

Contribuições do autor

Conceitualização: A.P. Rodrigues. e M.P. Miguel. Curadoria de Dados: A.P. Rodrigues., M.P. Miguel. Análise Formal: A.P. Rodrigues., M.T. Carvalho e M.P. Miguel. Investigação: A.P. Rodrigues, M.T. Carvalho, H.H. Ferreira, L.B. Menezes e M.P. Miguel. Administração do Projeto: A.P. Rodrigues. e M.P. Miguel. Recursos: A.P. Rodrigues, M.T. Carvalho, H.H. Ferreira, L.B. Menezes e M.P. Miguel. Administração do Projeto: A.P. Rodrigues., M.P. Miguel e L.B. Menezes. Redação (rascunho original, revisão e edição): A.P. Rodrigues, M.T. Carvalho, H.H. Ferreira, L.B. Menezes e M.P. Miguel.

Agradecimentos

Agradecemos a Gisleine Fernanda França e ao Laboratório de Histotécnica e Inovação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pelo suporte técnico e infraestrutura para o processamento das amostras.

Financiamento

Pesquisa financiada por uma bolsa de pós-graduação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Salas Y, Marquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>
2. Zink D, Fischer AH, Nickerson JA. Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. Sep 2004;4(9):677-87. <https://doi.org/10.1038/nrc1430>
3. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol*. Jan 2011;48(1):117-31. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>
4. Fischer A H, Jacobson K A, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008 May 1;2008:pdb.prot4986. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
5. Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol*. Feb 2014;22(1):12-32. doi: <https://doi.org/10.1177/1066896913517939>
6. Bignold LP, Coghlan BL, Jersmann HP. Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. *Exs*. 2006;(96):1-24. doi: https://doi.org/10.1007/3-7643-7378-4_1
7. De Vico G, Maiolino P, Cataldi M, Mazzullo G, Restucci B. Nuclear morphometry in relation to lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Res Commun*. Nov 2007;31(8):1005-11. doi: <https://doi.org/10.1007/s11259-006-0108-7>
8. Mello MLS, Vidal BC. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochem*. Jul 2017;119(6):603-609. <https://doi.org/doi:10.1016/j.acthis.2017.07.002>
9. Lakadamyali M, Lakadamyali M. From feulgen to modern methods: marking a century of DNA imaging advances. *Histochemistry and Cell Biology* 2024 162:1. 2024-05-16;162(1). doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02291-z>
10. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. Nov 1991;19(5):403-10. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
11. Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. 2014. <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/5386>
12. Pires ARC, Andreiulo FdM, Souza SRd. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diagnostic Pathology*. 2006 Jul 25;1(1). doi: <https://doi.org/10.1186/1746-1596-1-14>
13. Carella F, De Vico G, Landini G. Nuclear morphometry and ploidy of normal and neoplastic haemocytes in mussels. *PLoS One*. 2017;12(3)doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173219>
14. Papakonstantinou S, O'Brien PJ. "High Content Imaging for the Morphometric Diagnosis and Immunophenotypic Prognosis of Canine Lymphomas". *Cytometry B Clin Cytom*. Feb 28 2014;doi: <https://doi.org/10.1002/cytob.21170>
15. Simeonov R, Simeonova G. Computerized cytomorphometric analysis of nuclear area, nuclear perimeter and mean nuclear diameter in spontaneous canine mammary gland tumours. *Vet Res Commun*. Jul 2007;31(5):553-8. doi: <https://doi.org/10.1007/s11259-007-3562-y>
16. Destexhe E, Bicker E, Coignoul F. Image analysis evaluation of ploidy, S-phase fraction and nuclear area in canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 1995/10/01;113(3)doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80036-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80036-2)
17. Cassali GD, Bertagnolli AC, Gärtner F, Schmitt F. Canine mammary tumours: A quantitative DNA study using static cytometry. *Revista Española de Patología*. 2011/10/01;44(4)doi: <https://doi.org/10.1016/j.patol.2011.05.005>
18. El Din AA, Badawi MA, Aal SE, Ibrahim NA, Morsy FA, Shaffie NM. DNA Cytometry and Nuclear Morphometry in Ovarian Benign, Borderline and Malignant Tumors. *Open Access Maced J Med Sci*. Dec 15 2015;3(4):537-44. doi: <https://doi.org/10.3889/oamjms.2015.104>
19. Yang X, Xiao X, Wu W, *et al.* Cytological study of DNA content and nuclear morphometric analysis for aid in the diagnosis of high-grade dysplasia within oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. Sep 2017;124(3):280-285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.05.509>
20. Kesarkar K, Tamgadge A, Peirera T, Tamgadge S, Gotmare S, Kamat P. Evaluation of Mitotic Figures and Cellular and Nuclear Morphometry of Various Histopathological Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma: Comparative study using crystal violet and Feulgen stains. *Sultan Qaboos Univ Med J*. May 2018;18(2):e149-e154. doi: <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.02.005>
21. De Potter CR, Praet MM, Slavin RE, Verbeeck P, Roels HJ. Feulgen DNA content and mitotic activity in proliferative breast disease. A comparison with ductal carcinoma in situ. *Histopathology*. Dec 1987;11(12):1307-19.
22. Diamond DA, Berry SJ, Jewett HJ, Eggleston JC, Coffey DS. A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. *J Urol*. Oct 1982;128(4):729-34. doi: [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)53158-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)53158-4)
23. Andrea Carlos Eduardo, Bleggi-Torres Luiz Fernando, Seixas AMTd. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab*. 2008;44: 51-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442008000100010>.

24. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. OriginalPaper. BMC Bioinformatics. 2017-11-29 2017;18(1):1-26:doi: <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
25. Burrai GP, Gabrieli A, Moccia V, *et al.* A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study. Animals : an Open Access Journal from MDPI. 2020 Sep 18;10(9):doi: <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
26. Silva EMGd, Santos TRd, Silva MJB, da Silva EMG, dos Santos TR, Silva MJB. Identifying the Risk Factors for Malignant Mammary Tumors in Dogs: A Retrospective Study. Veterinary Sciences 2023, Vol 10, Page 607. 2023-10-05;10(10):doi: <https://doi.org/10.3390/vetsci10100607>
27. Rodríguez J, Santana Á, Herráez P, Killick DR, Monteros AEdl. Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain. BMC Veterinary Research. 2022 Jul 11;18(1):doi: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03363-9>
28. Howell A, Bleehen NM, Taylor PJ. Nuclear morphometry and glutathione S-transferase pi expression in breast cancer. Oncol Rep. 2000 May-Jun;7(3):525–528. <https://doi.org/10.3892/or.7.3.609>
29. Rasotto R, Berlatto D, Goldschmidt MH, Zappulli V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. Vet Pathol. Jul 2017;54(4):571-578. doi: <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
30. Kashyap A, Jain M, Shukla S, Andley M. Study of nuclear morphometry on cytology specimens of benign and malignant breast lesions: A study of 122 cases. J Cytol. Jan-Mar 2017;34(1):10-15. doi: <https://doi.org/10.4103/0970-9371.197591>
31. Di Donato G, Laufer-Amorim R, Palmieri C. Nuclear morphometry in histological specimens of canine prostate cancer: Correlation with histological subtypes, Gleason score, methods of collection and survival time. Res Vet Sci. Oct 2017;114:212-217. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.007>
32. Nativ O, Sabo E, Reiss R, Moskovitz B, Melamed M, Gutman M. The role of nuclear morphometry for predicting disease outcome in patients with localized renal cell carcinoma. Cancer. 1995 Oct 15;76(8):1447–1452. doi: <https://doi.org/10.1002/1097-0142>
33. Andrea CE, Petrilli AS, Jesus-Garcia R, Bleggi-Torres LF, MT. A. Large and Round Tumor Nuclei in Osteosarcoma: Good Clinical Outcome. International journal of clinical and experimental pathology. 01/30/2011 2011;4(2)
34. Biggiogera M, Cavallo M, Casali C. A brief history of the Feulgen reaction. Histochemistry and Cell Biology. 2024 Apr 12;162(1-2):doi: <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02279-9>