

**THAIS BARROSO SARANDY**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E QUANTIFICAÇÃO DO  
COLÁGENO TIPO I E III DO CARCINOMA MAMÁRIO CANINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição

Coorientadoras: Sirley Adriana Bedoya  
Emily Correna Carlo Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S243c  
2021 Sarandy, Thais Barroso, 1992-  
Caracterização histomorfométrica e quantificação do  
colágeno tipo I e III do carcinoma mamário canino / Thais  
Barroso Sarandy. – Viçosa, MG, 2021.  
1 dissertação eletrônica (53 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2021.  
Referências bibliográficas: f. 46-53.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.189>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças. 2. Neoplasia de mama. 3. Metástase.  
4. Matriz extracelular. 5. Pulmões. 6. Composto azo. 7. Mamas -  
Câncer - Prognóstico. 8. Morfometria. I. Conceição, Lissandro  
Gonçalves, 1963-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.70896994

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

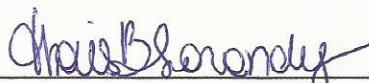
**THAIS BARROSO SARANDY**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO TIPO I E III DO CARCINOMA MAMÁRIO CANINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

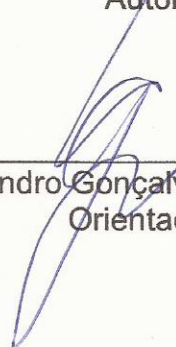
APROVADA: 25 de agosto de 2021.

Assentimento:



Thais Barroso Sarandy

Autora

---

Lissandro Gonçalves Conceição

Orientador

À minha família, meus maiores  
incentivadores e exemplos de vida. Devo  
tudo o que sou a vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e Nossa Senhora, por terem me concedido força, coragem e resiliência para conseguir finalizar mais uma etapa.

Aos meus pais, Lucinei Sarandy Costa e Maria de Lourdes Barroso por serem meus maiores incentivadores, por me darem todo o apoio, carinho e compreensão não só durante esta fase, mas em toda a minha vida.

Ao meu irmão e grande amigo, Felipe Barroso Sarandy, pela força, apoio e cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu noivo Aymbiré, por seu companheirismo, amor, força, amizade e apoio em todos os momentos.

A Mel, minha filha de quatro patas que faz os meus dias mais felizes.

Aos meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram e me incentivaram e que compreenderam minha ausência durante este período.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao professor e orientador Lissandro Gonçalves Conceição, exemplo de profissional, por todo o apoio, compreensão, paciência, orientação, ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

As minhas co-orientadoras Profa. Adriana Bedoya e Profa. Emily Carlo, pela disponibilidade, atenção e ensinamentos compartilhados.

Aos técnicos do laboratório de Histopatologia da UFV, Seu Adão e Cláudio, muito obrigada pelo acolhimento, apoio e ensinamentos durante este período.

A coordenação do Programa de pós-graduação, em especial à Rosi que sempre se mostrou disponível para ajudar e tirar as minhas dúvidas.

Aos professores Carlos Eduardo e Fabrício Valente do DVT-UFV pela atenção e ensinamentos compartilhados.

Ao Pós-Doutorando Jurandir, pela participação e ajuda na pesquisa.

Aos professores Andréa Pacheco, Adriana Bedoya, Emily Carlo, Paulo Renato Santos e Tatiana Schmitz por aceitarem o convite para participar da minha banca de mestrado e contribuir com seus conhecimentos na pesquisa.

Aos amigos da pós-graduação do DVT-UFV pelo apoio e conhecimentos compartilhados, em especial aos meus amigos Luís Henrique, Jéssica, Elaine e Amanda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos residentes da veterinária da UFV do ano de 2019-2021 pelo acolhimento, atenção e conhecimentos compartilhados durante o período do estágio e do mestrado.

A Coordenadora Profa. Reggiani Vilela Gonçalves e à técnica Maria Lúcia do laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) e à Coordenadora Profa. Maria Catarina Megumi Kasuya e à técnica Camila do Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO) da UFV, agradeço pela atenção e por disponibilizarem os laboratórios e equipamentos que foram essenciais para a execução da minha pesquisa.

Aos funcionários e técnicos do Hospital Veterinário e do DVT-UFV pela atenção e disponibilidade.

A todos os animais que, em vida ou após a morte, contribuíram com meu aprendizado.

## RESUMO

SARANDY, Thais Barroso, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2021. **Caracterização histomorfométrica e quantificação do colágeno tipo I e III do carcinoma mamário canino.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição  
Coorientadores: Sirley Adriana Bedoya e Emily Correna Carlo Reis.

As neoplasias mamárias são comumente encontradas em cães e a metástase pulmonar é considerada a principal causa de morte. A remodelação da matriz extracelular pode influenciar na progressão, invasão e metástases. Objetivou-se caracterizar o carcinoma mamário canino com e sem metástases pulmonares. Foram selecionadas 26 amostras em blocos de parafina de cães com carcinoma mamário nos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da UFV. Foram realizadas fotomicrografias e avaliações dos cortes histológicos em hematoxilina e eosina e *Picrosirius red* com luz polarizada. Nas análises histopatológicas foram realizadas a contagem mitótica, intensidade da necrose e do infiltrado inflamatório e análises morfométricas do núcleo, proporção das células carcinomatosas, necrose, células inflamatórias e vasos sanguíneos e quantificação do colágeno tipo I e III. A contagem mitótica e a intensidade da necrose foram maiores em carcinomas mamários de grau III. Na análise dos colágenos, a concentração dos colágenos tipo I e tipo III não foram influenciadas pelo grau e ocorrência de metástase. Nos carcinomas em tumor misto houve maior quantidade de colágeno tipo I nas neoplasias de grau I. A mensuração dos núcleos e as proporções de células carcinomatosas, necrose, células inflamatórias e vasos sanguíneos não foram significativas em relação aos graus e os grupos. Nos carcinomas em tumor misto houve uma relação significativa entre os núcleos com diâmetros maiores e a ausência de metástases. Os resultados demonstram que há maior relação entre o grau dos carcinomas mamários com as variáveis avaliadas, independente da presença ou ausência de metástase pulmonar. Estudos futuros com maior quantidade de amostras são recomendados para a avaliação das características do carcinoma mamário canino e sua relação com o microambiente tumoral e a metástase pulmonar.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Metástases. Matriz extracelular. Pulmões. Morfometria. *Picrosirius red*. Prognóstico.

## ABSTRACT

SARANDY, Thais Barroso, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2021. **Histomorphometric characterization and quantification of collagen types I and III in canine mammary carcinoma.** Advisor: Lissandro Gonçalves Conceição Co-advisors: Sirley Adriana Bedoya and Emily Correna Carlo Reis.

Mammary neoplasms are commonly found in dogs and lung metastasis is considered the main cause of death. Extracellular matrix remodeling can influence progression, invasion and metastases. The objective was to characterize canine mammary carcinoma with and without lung metastases. Twenty-six samples were selected in paraffin blocks from dogs with mammary carcinoma from the archives of the Laboratory of Veterinary Pathology at UFV. Photomicrographs and evaluations of the histological sections were performed in hematoxylin and eosin and Picrosirius red with polarized light. In the histopathological analysis, mitotic count, intensity of necrosis and inflammatory infiltrate and morphometric analysis of the nucleus, proportion of carcinoma cells, necrosis, inflammatory cells and blood vessels and quantification of collagen type I and III were performed. Mitotic count and necrosis intensity were higher in grade III breast carcinomas. In the collagen analysis, the concentration of type I and type III collagens were not influenced by the degree and occurrence of metastasis. In mixed tumor carcinomas, there was a greater amount of type I collagen in grade I neoplasms. The measurement of nuclei and the proportions of carcinoma cells, necrosis, inflammatory cells and blood vessels were not significant in relation to grades and groups. In mixed tumor carcinomas, there was a significant relationship between nuclei with larger diameters and the absence of metastases. The results demonstrate that there is a greater relationship between the grade of breast carcinomas and the variables evaluated, regardless of the presence or absence of lung metastasis. Future studies with more samples are recommended to evaluate the characteristics of canine mammary carcinoma and its relationship with the tumor microenvironment and lung metastasis.

**Keywords:** Breast cancer. Metastases. Lungs. Extracellular matrix. Morphometry. Picrosirius red. Prognosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografia da glândula mamária canina normal em repouso com a coloração de Hematoxilina e eosina (adaptado de Goldschmidt et al, 2017). .....	14
Figura 2. Hormônios envolvidos no crescimento da glândula mamária e na fase inicial da secreção de leite (Adaptado de Klein, 2014).....	15
Figura 3. Fotomicrografia com a técnica PR/P dos colágenos tipo I e III na derme da região da glândula mamária mensurados com o software <i>Image J</i> usando o plug-in <i>Threshold Colour</i> .....	29
Figura 4. Representação gráfica da contagem mitótica nos carcinomas mamários..	31
Figura 5. Representação gráfica da contagem mitótica nos carcinomas em tumor misto.....	31
Figura 6. Representação gráfica da intensidade da necrose nos carcinomas mamários .....	32
Figura 7. Representação gráfica da Intensidade da necrose nos carcinomas em tumor misto.....	32
Figura 8. Representação gráfica da intensidade do infiltrado inflamatório nos carcinomas mamários .....	33
Figura 9. Representação gráfica da intensidade do infiltrado inflamatório nos carcinomas em tumor misto. ....	33
Figura 10. Fotomicrografias com a técnica de PR/P dos colágenos tipo I e III nos carcinomas mamários. ....	34
Figura 11. Representação gráfica da porcentagem do colágeno tipo I mensurado nos carcinomas mamários. ....	35
Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo I mensurado nos carcinomas em tumor misto. ....	35
Figura 13. Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo III mensurados nos carcinomas mamários.....	36
Figura 14. Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo III mensurados nos carcinomas em tumor misto.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento dos tumores mamários caninos (Owen, 1980). .....	18
Tabela 2. Graduação histológica dos carcinomas mamários caninos e felinos (Elston e Ellis, 1991).....	19
Tabela 3. Classificação das neoplasia mamárias canina modificada por Cassali et al. (2013).....	20
Tabela 4. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas mamários (média ± erro-padrão).....	37
Tabela 5. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas em tumor misto em relação ao grupo (média ± erro-padrão). .....	38
Tabela 6. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas em tumor misto em relação ao grau (média ± erro-padrão). .....	38
Tabela 7. Porcentagens da densidade volumétrica nos carcinomas mamários para as células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório em relação aos grupos e graus (média ± erro padrão). .....	39
Tabela 8. Porcentagens da densidade volumétrica nos carcinomas em tumor misto para as células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório em relação aos grupos e graus (média ± erro padrão). .....	40

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Anatomia e histologia da glândula mamária canina .....	12
2.1.1. Fisiologia da glândula mamária .....	14
2.2. Neoplasias mamárias.....	15
2.2.1. Epidemiologia e fatores de risco .....	15
2.2.2. Apresentação clínica.....	17
2.2.3 Estadiamento clínico .....	17
2.2.4. Classificação e graduação histopatológica .....	18
2.2.5. Marcadores prognósticos e preditivos .....	21
2.3 Morfometria .....	22
2.4. Matriz extracelular e o câncer de mama .....	22
2.5. <i>Picrosirius red</i> .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1. Comitê de ética .....	25
3.2. Materiais dos pacientes .....	25
3.3. Análise histopatológica .....	26
3.4. Análise morfométrica .....	27
3.5 Análise estatística .....	29
4. RESULTADOS .....	30
4.1 Análise histopatológica .....	30
4.2 Análise morfométrica .....	33
5. DISCUSSÃO .....	41
6. CONCLUSÕES .....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são comumente encontradas em cães, gatos, humanos e raras em outras espécies (Goldschmidt et al., 2017). Na espécie canina, são as neoplasias com maior incidência e representam cerca de 50-70 % das neoplasias diagnosticadas em cadelas não castradas (Sorenmo et al., 2020), sendo que a metástase pulmonar é considerada a principal causa de morte em cadelas com carcinoma mamário (Misdorp, 2002).

O exame histopatológico é considerado o melhor método para o diagnóstico das neoplasias mamárias (Misdorp, 2017). Por este exame é possível realizar a classificação e a gradação da neoplasia. Além disto, permite serem analisadas áreas de infiltração na pele, tecidos moles, vasos sanguíneos e linfáticos, a margem cirúrgica, entre outros componentes que podem ser importantes para o prognóstico (Ferreira et al., 2003). Porém, pode haver subjetividade na avaliação histopatológica que pode ser reduzida com a utilização de análises mais precisas como a técnica de morfometria (Webster et al., 2011).

Além das alterações que ocorrem nas células neoplásicas, o microambiente tumoral também é intensamente alterado, dentre essas alterações destacam-se o aumento do número de fibroblastos, miofibroblastos, infiltrado inflamatório, angiogênese e remodelação da matriz extracelular (MEC) (Franco et al., 2010).

A remodelação da MEC nas neoplasias mamárias pode levar a uma interação entre os componentes da matriz e as células neoplásicas que, por diversos mecanismos, facilitam a invasão e metástases (Lochter; Bissell, 1995). As fibras de colágeno tipo I são os principais constituintes da MEC, sendo que nas neoplasias mamárias malignas o aumento desta proteína está diretamente relacionada com a proliferação, invasão e metástases (Provenzano et al., 2008; Brabrand et al., 2015) em linfonodos regionais (Rizwan et al., 2015) e nos pulmões (Provenzano et al., 2008).

Na medicina veterinária foram realizados poucos estudos para o melhor entendimento dessa interação entre o câncer de mama e a MEC em comparação aos estudos humanos (Case et al., 2017; Rosen et al., 2020).

Diante deste contexto, os estudos voltados para a compreensão das alterações dos componentes da MEC no câncer mamário e suas interações com as células neoplásicas pode ser de grande valor para o desenvolvimento de um melhor prognóstico e estratégias terapêuticas. Além disso, a espécie canina pode ser considerada um bom modelo de estudo para neoplasias mamárias na patologia comparada, por causa da similaridade em diversos aspectos com as neoplasias mamárias humanas (De Nardi et al., 2016; Gray et al., 2020). Sendo assim, objetivou-se neste estudo, fazer a caracterização histopatológica, morfométrica e quantificar as fibras de colágeno tipo I e tipo III do carcinoma mamário canino com e sem metástases pulmonares.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Anatomia e histologia da glândula mamária canina**

A glândula mamária da cadela é normalmente formada por 10 complexos mamários ou pares de glândulas mamárias dispostos em duas fileiras bilaterais simétricas que se estendem da região do tórax para a região inguinal. A quantidade de complexos pode variar, raças de grande porte possuem de quatro a seis pares enquanto os de pequeno porte geralmente possuem quatro pares de glândulas mamárias (Reese et al., 2016; Nogueira e Castro, 2017).

Os complexos mamários são denominados de acordo com a sua posição: complexo torácico cranial e caudal, complexo abdominal cranial e caudal e complexo inguinal, sendo que cada um deles é formado por cinco a 20 unidades mamárias com ductos papilares que se abrem na extremidade da papila por um óstio papilar (Reese et al., 2016).

A irrigação da glândula mamária é fornecida pelos ramos mamários da artéria torácica lateral. Os vasos linfáticos do complexo mamário torácico cranial drenam para o linfonodo axilar e cervical superficial. Enquanto os vasos linfáticos do complexo abdominal cranial podem drenar tanto para o linfonodo axilar e o linfonodo inguinal superficial e o complexo abdominal caudal pode drenar para os linfonodos ilíacos mediais (Reese et al., 2016).

A glândula mamária da cadela é classificada como uma glândula exócrina, composta, tubuloacinar/tubuloalveolar apócrina. Cada glândula mamária é formada

por um corpo mamário e papila mamária que desemboca nos óstios dos ductos lactíferos principais (Figura 1) (Nogueira e Castro, 2017).

A glândula mamária, é revestida externamente por pele abdominal que recobre o teta com epiderme fina e pilosa. Na superfície da teta estão presentes os ductos revestidos por epitélio estratificado escamoso com tampão de queratina no lúmen. Ao redor da abertura da teta há um esfíncter de musculo liso. Abaixo da epiderme há a hipoderme que produz o tecido adiposo pericapsular que circunda cada glândula e em seguida, o tecido conjuntivo de sustentação estrutural que envolve o parênquima glandular (Sorenmo et al., 2011; Nogueira e Castro, 2017). A estimulação de hormônios ovarianos, hipofisários e placentários podem modificar a estrutura mamária, esse estímulo pode ocorrer durante a gestação, puberdade, lactação e involução (Nogueira e Castro, 2017).

A glândula mamária em repouso é caracterizada pelo predomínio de tecido conjuntivo de sustentação sobre o parênquima epitelial. As formações conjuntivas de sustentação são formadas por um tecido conjuntivo (TC) denso com pouca celularidade. O parênquima epitelial, inicialmente não tem adenômeros/tubuloácinos glandulares e é constituído de ductos lactíferos ou galactóforos de diferentes tamanhos (Figura 1) (Nogueira e Castro, 2017).

Os ductos maiores são revestidos por um epitélio cuboidal de duas camadas e circundados por células mioepiteliais fusiformes e os ductos menores possuem uma única camada de epitélio cuboidal e células mioepiteliais fusiformes. Os alvéolos não secretores são similares aos pequenos ductos. As células alveolares secretoras variam de cuboidal a colunar e têm gotículas de gordura intracelular que se acumulam no lúmen dos alvéolos. O epitélio glandular é circundado pela membrana basal composta de colágeno tipo IV, laminina, entactina, proteoglicanos e sulfato de heparina. (Sorenmo et al., 2011).

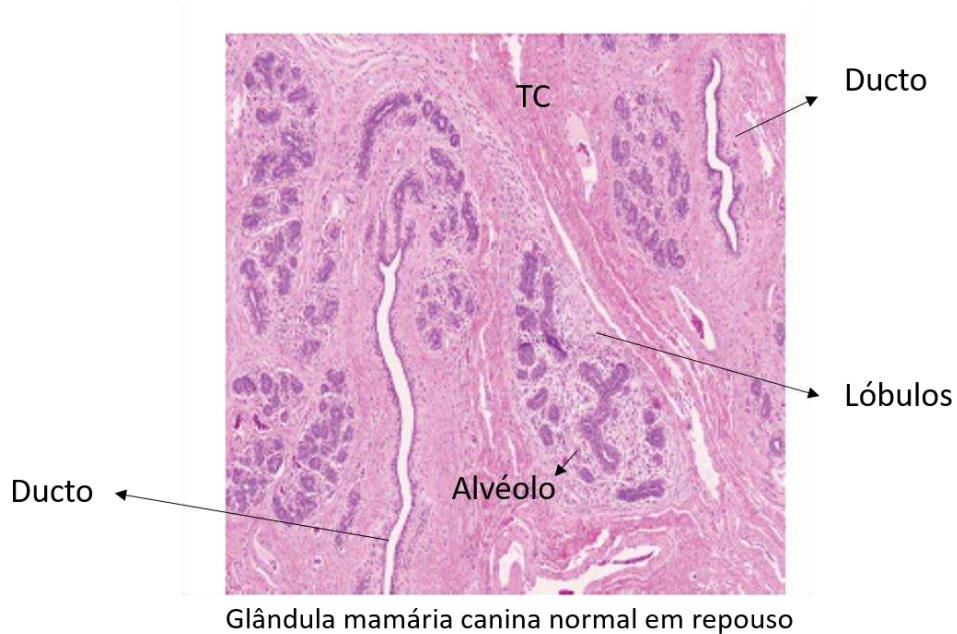


Figura 1. Fotomicrografia da glândula mamária canina normal em repouso com a coloração de Hematoxilina e eosina (adaptado de Goldschmidt et al, 2017).

As glândulas mamárias são sustentadas por um estroma, formado por tecido conjuntivo, tecido adiposo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e invariavelmente podem ser encontradas células inflamatórias como mastócitos, histiócitos e células linfoides (Sorenmo et al., 2011).

O tecido conjuntivo pode ser dividido em dois componentes: tecido conjuntivo intralobular composto de fibras de colágeno mais finas e com maior proporção de MEC enquanto o interlobular que separa os lóbulos, é constituído por fibras de colágeno mais largas e pouca quantidade de MEC (Sorenmo et al., 2011).

### 2.1.1. Fisiologia da glândula mamária

O desenvolvimento das glândulas mamárias na vida pós-fetal se inicia normalmente na puberdade, e ocorre devido a ação dos hormônios liberados pelos ovários como o estrogênio e progesterona. Contudo, as glândulas permanecem pouco ativas até o início da gestação (Klein, 2014). No desenvolvimento e proliferação do sistema ductal, os hormônios responsáveis são, respectivamente, o estrogênio, o hormônio do crescimento e esteroides liberados pelas adrenais. Enquanto no desenvolvimento dos alvéolos mamários tem a ação adicional dos hormônios progesterona e prolactina (Klein, 2014) (figura 2).

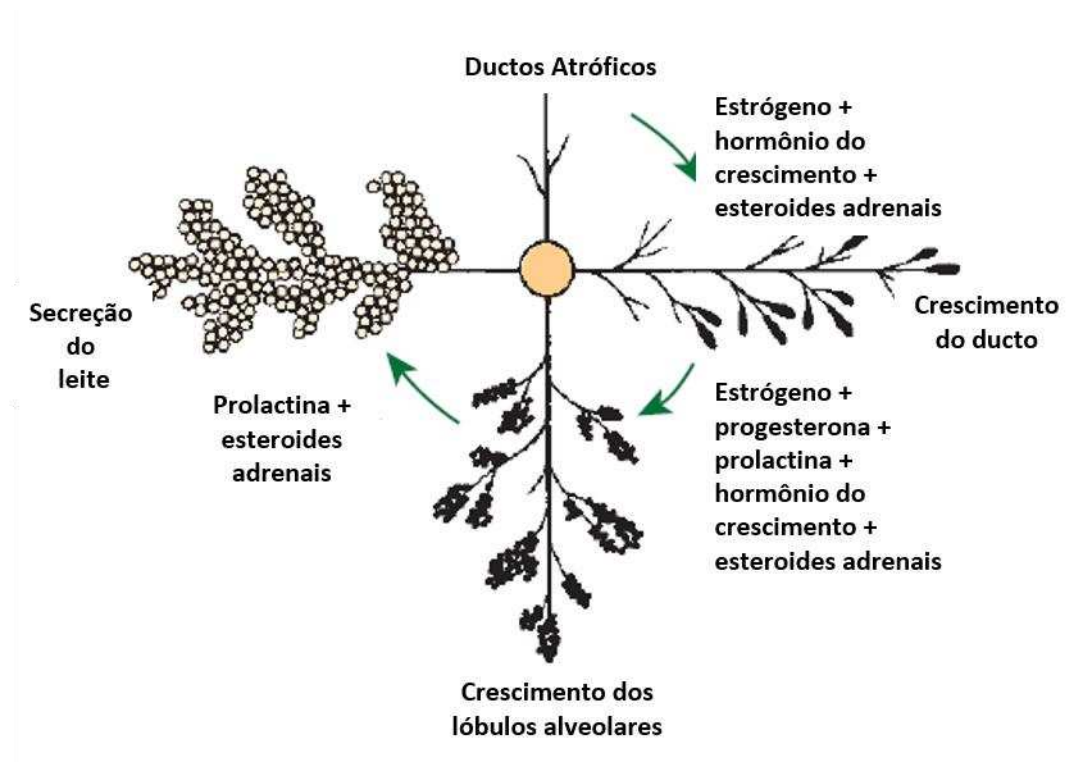


Figura 2. Hormônios envolvidos no crescimento da glândula mamária e na fase inicial da secreção de leite (Adaptado de Klein, 2014).

A glândula mamária com exposição contínua a esses hormônios ovarianos, como a progesterona e o estrogênio, aumenta significativamente as chances do surgimento de neoplasia (Klein, 2014).

## 2.2. Neoplasias mamárias

### 2.2.1. Epidemiologia e fatores de risco

As neoplasias mamárias são as mais comumente encontradas em cadelas. As taxas de incidência desta doença estão relacionadas com a localização geográfica dos animais (Sorenmo et al., 2020). Nos estados Unidos, a incidência é considerada baixa, principalmente por causa da prática de castração precoce, enquanto que em alguns países da Europa as taxas são maiores (Sorenmo et al., 2020). De acordo com estudos realizados em alguns estados do Brasil, as taxas de incidência são consideradas altas, semelhante às taxas encontradas na Europa (Nunes et al., 2018; Oliveira Filho et al., 2010).

Alguns fatores de risco estão diretamente relacionados com o desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas, que incluem idade, estado reprodutivo, exposição a

hormônios exógenos, predisposição racial, dieta e obesidade (Goldschmidt et al., 2017).

As neoplasias mamárias geralmente afetam cadelas com idade média entre 7 e 13 anos e são raras em cadelas com menos de 5 anos (Zatloukal et al., 2005; Goldschmidt et al., 2001). Em um estudo retrospectivo realizado por Nunes et al., (2018), foram avaliados 1500 cães com neoplasias mamárias, a idade média de ocorrência das neoplasias benignas foram em cadelas com 8 anos e das neoplasias malignas com 10 anos de idade.

Estudos demonstraram que muitas neoplasias da glândula mamária podem ser prevenidas com a realização da ovariectomia (OSH) (Schneider et al., 1969; Goldschmidt et al., 2017; Sorenmo et al., 2020). Cães castrados antes do primeiro cio tem 0,5% de chances de ter neoplasias mamárias. A prevenção da OSH reduz após os primeiros ciclos estrais, sendo que após os 4 anos de idade não foram encontrados benefícios (Schneider et al., 1969; Goldschmidt et al., 2017).

A exposição a hormônios exógenos como os progestágenos e estrogênios está relacionado com o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cães (Misdorp,1991; Goldschmidt et al., 2017). A administração de progestágenos em baixas doses pode induzir o desenvolvimento de neoplasias benignas, enquanto que a administração de progestágenos associado com estrogênios podem induzir a formação de neoplasias malignas (Misdorp,1991).

São várias as raças de cães afetadas com neoplasias mamárias e podem variar de acordo com a localização geográfica (Nunes et al., 2017). No entanto, estudos em diversos países apontam que animais de pequeno porte e de raças puras são mais comumente afetados comparado aos de grande porte (Goldschmidt et al., 2017). As raças com maior predominância de neoplasias mamárias reportadas são Poodle, Maltês, Shitzu, Yorkshire Terrier, Chiuaua, Coker Spaniel e Dushrrounds (Dorn et al., 1968; Zatloukal et al., 2005; Nunes et al., 2018).

Estudos observacionais relataram uma correlação entre a dieta e risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias (Goldschmidt et al., 2017). Cães com dietas a base de grande quantidade de gorduras e pouca proteína aumentam o risco do desenvolvimento de neoplasias mamárias (Perez et al., 1998). Da mesma forma,

em mulheres há uma forte relação entre dieta e o risco de desenvolver neoplasias mamárias malignas (Goldschmidt et al., 2017).

### *2.2.2. Apresentação clínica*

A maioria dos animais pode apresentar mais de uma neoplasia mamária na cadeia mamária, sendo que as glândulas abdominais caudais e inguinais são as mais frequentemente afetadas em comparação com as glândulas craniais, possivelmente por apresentarem maior quantidade de parênquima mamário e serem mais susceptíveis a ação de hormônios (Sorenmo et al., 2011; Goldschmidt et al., 2017).

Tumores pequenos (<1,0 cm de diâmetro) tem maior probabilidade de serem benignos, enquanto nos tumores maiores (3,0 a 5,0 cm de diâmetro) tem uma maior chance de serem malignos (Goldschmidt et al., 2001). No entanto, este critério não pode ser usado isoladamente, o diagnóstico histopatológico é o mais indicado para distinguir os tumores benignos e malignos (Goldschmidt et al., 2017).

Macroscopicamente as neoplasias mamárias caninas se apresentam como nódulos circunscritos ou tumorações que podem variar em relação ao tamanho e consistência (Cassali et al., 2011). Além disso, podem também estar associadas com ulceração da pele que recobre a neoplasia e com reação inflamatória local (Cassali et al., 2011).

A maior parte dos cães com tumores de mama, não apresentam sinais clínicos sistêmicos, porém, nos casos de doença metastática e no carcinoma inflamatório, os animais podem apresentar sinais clínicos como caquexia e insuficiência respiratória (Perez et al., 2001; Marconato et al., 2009).

### *2.2.3 Estadiamento clínico*

Devido ao risco de metástases associado a neoplasias mamárias malignas, é recomendado que se faça o estadiamento clínico antes do início do tratamento. O estadiamento clínico inclui a realização de hemograma completo, bioquímica sérica, radiografia torácica em três projeções (lateral direita, lateral esquerda e ventrodorsal), citologia dos linfonodos regionais ou sentinelas e biopsia (Soultani et al., 2017; Pereira et al., 2008).

As neoplasias mamárias devem ser estadiadas clinicamente seguindo os critérios propostos pelo sistema T (tamanho do tumor) N (metástase em linfonodo) M (metástases a distância) de Owen modificado (Owen, 1980). Neste sistema é realizada uma graduação de I a V levando em consideração o tamanho do tumor, metástases em linfonodos e a distância e dessa forma associar com o prognóstico dos animais (Owen, 1980). As neoplasias menores de 3,0 cm são grau I, as neoplasias entre 3,0 e 5,0 cm são grau II e neoplasias maiores de 5,0 cm são grau III. As graduações IV e V não levam em consideração o tamanho da neoplasia mas sim as metástases em linfonodos regionais e a distância respectivamente (Owen, 1980; Sorenmo et al., 2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Estadiamento dos tumores mamários caninos (Owen, 1980).

<b>Graduação</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
I	< 3,0 cm	N0	M0
II	3,0 - 5,0 cm	N0	M0
III	> 5,0 cm	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

T: tamanho do tumor.

N0: ausência de metástase em linfonodo; N1: presença de metástase em linfonodos.

M0: ausência de metástases; M1: presença de metástases a distância.

#### *2.2.4. Classificação e graduação histopatológica*

A avaliação histopatológica é considerada como o melhor método para o diagnóstico das neoplasias mamárias, por ela é possível determinar o tipo de tumor, graduação e prognóstico (Sorenmo et al., 2020).

As graduações histopatológicas das neoplasias mamárias utilizadas na medicina veterinária são baseadas no sistema de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1991). De acordo com esse sistema, a graduação é baseada nas características de diferenciação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Após a avaliação dessas características histopatológicas, é realizado o somatório de pontos que pode variar de 3 a 9 pontos. As pontuações de 3-5 são consideradas grau I, de 6-7 grau II

e de 8-9 pontos grau III. Esta graduação é considerada um bom indicador prognóstico nas neoplasias mamárias primárias (Cassali et al., 2011; Cassali et al., 2020) (Tabela 2).

Tabela 2. Graduação histológica dos carcinomas mamários caninos e felinos (Elston e Ellis, 1991).

<b>Escore</b>	<b>Formação tubular</b>	<b>Pleomorfismo nuclear</b>	<b>Índice mitótico</b>
1	> 75%	Tamanho nuclear similar a célula normal	0-8 mitoses em 10 campos de 400x
2	10 to 75%	Aumento moderado de tamanho e variação	9-16 mitoses em 10 campos de 400x
3	< 10%	Variação marcada	≥ 17 mitoses em 10 campos de 400x
<b>Grau histológico</b>			
3-5 pontos		Grau I	
6-7 pontos		Grau II	
8-9 pontos		Grau III	

As classificações histopatológicas das neoplasias mamárias em cães e gatos foram inicialmente propostas em 1974 (Hampe e Misdorp, 1974) posteriormente, foi publicado um novo sistema de classificação em cães por Goldschmidt et al, (2011) e Cassali et al, (2011) (tabela 3).

Na classificação adaptada por Cassali e colaboradores em 2011 as neoplasias consideradas benignas e malignas são classificadas de acordo com o tipo celular neoplásico. A proliferação pode ser do epitélio glandular (células epiteliais luminais ou mioepiteliais) e do tecido conjuntivo mesenquimal. Estudos realizados no Brasil, demonstram que cerca de 90% das neoplasias mamárias diagnosticadas são carcinomas (Gamba et al., 2017).

Tabela 3. Classificação das neoplasias mamárias caninas modificada por Cassali, et al. (2020).

<b>Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas</b>					
<b>Tumores benignos</b>	<b>Tumores malignos (carcinomas)</b>	<b>Tumores malignos (tipos especiais)</b>	<b>Neoplasias mioepiteliais</b>	<b>Sarcomas</b>	<b>Outros sarcomas</b>
Adenoma	Carcinoma <i>in situ</i> (ductal ou lobular)	Carcinoma micropapilar	Adenomioepitelioma maligno	Fibrossarcoma	Condrossarcoma
Adenomioepitelioma	Carcinoma em tumor misto	Carcinoma lobular pleomórfico	Mioepitelioma maligno	Osteossarcoma	lipossarcoma
Miopitelioma	Carcinoma papilar	Carcinoma secretório		Carcinossarcoma	Hemangiossarcoma
Fibroadenoma	Carcinoma tubular	Carcinoma mucinoso		Sarcoma em tumor misto	Sarcoma Filóides
Adenoma basalóide	Carcinoma sólido	Carcinoma rico em lipídeos			
Tumor misto benigno	Carcinoma basalóide	Carcinoma rico em glicogênio			
Papiloma ductal	Carcinoma cribiforme	Carcinoma de células escamosas			
Tumor Filóides		Carcinoma com diferenciação sebácea			

As neoplasias benignas são caracterizadas como lesões expansivas, não invasivas e bem delimitadas, compostas por células bem diferenciadas, e que podem ser indistinguíveis das células de origem (Damasceno et al., 2017).

As neoplasias epiteliais malignas são classificadas como carcinomas *in situ* (não infiltrativas), carcinomas simples (proliferação epitelial) e carcinoma em tumor misto (proliferação epitelial, mioepitelial e mesenquimal). Os carcinomas simples são classificados como tubular, papilar e sólido (Cassali et al., 2011; Gamba et al., 2017). Há também, variantes especiais que apesar de raras, podem ser encontradas, que incluem os carcinomas mucinosos, fusiformes, lobulares (invasivos e pleomórficos), carcinomas de células escamosas, ricos em lipídeo, ricos em glicogênio, micropapilares invasivos, anaplásicos, com diferenciação sebácea e secretor (Cassali et al., 2011; Gamba et al., 2017).

No Brasil, os tipos histopatológicos benignos e malignos mais comumente diagnosticados em cadelas é o tumor misto benigno, o carcinoma em tumor misto (Damasceno et al., 2017; Gamba et al., 2017) e o carcinoma simples túbulo-papilar respectivamente (Oliveira Filho et al., 2010). Os carcinomas mamários podem fazer metástases via vasos linfáticos e sanguíneos para vários órgãos, dentre eles, os linfonodos regionais e pulmões são os mais comumente afetados, sendo que a metástase pulmonar é considerada a principal causa de morte em cadelas com carcinoma mamário (Misdorp, 2002).

#### *2.2.5. Marcadores prognósticos e preditivos*

Os marcadores prognósticos são características clínicas, patológicas ou moleculares dos pacientes ou doenças associadas ao resultado clínico, que permitem prever a evolução clínica e o tempo de sobrevivência do indivíduo (Webster et al., 2011). Os marcadores preditivos são aqueles que vão permitir selecionar pacientes para algum tipo de tratamento mais específico (Ferreira, et al., 2017).

Os principais fatores prognósticos nas neoplasias mamárias caninas envolvem fatores epidemiológicos (idade, raça e estado reprodutivo), clínicos (tamanho do tumor, status do linfonodo e estágio clínico), histológicos (tumor do tipo maligno e gradação) e imunoistoquímicos (Goldschmidt et al., 2017).

Os marcadores prognósticos imunoistoquímicos que foram estabelecidos para as neoplasias mamárias caninas são os marcadores COX-2, receptor de estrógeno e receptor de progesterona. Os marcadores preditivos são o COX-2, Ki-67, receptor de estrógeno e receptor de progesterona (Ferreira et al., 2017).

Estudos vem sendo realizados para determinar marcadores e fatores prognósticos na neoplasia mamária canina que envolvem os componentes do microambiente tumoral e da matriz extracelular (Rosen et al., 2020; Case et al., 2017; Estrela-Lima et al., 2010). Estes componentes influenciam em diversos mecanismos que levam a progressão tumoral, invasão e metástases (Rosen et al., 2020; Case et al., 2017; Estrela-Lima et al., 2010).

### **2.3 Morfometria**

A graduação histológica, marcação imunoistoquímica, pleomorfismo nuclear, contagens mitóticas e índices de proliferação e apoptose são frequentemente utilizados em estudos prognósticos, no entanto, pode haver subjetividade na avaliação desses aspectos (Webster et al., 2011). Diante disso, essa subjetividade pode ser reduzida com o uso de software de análise de imagem e morfometria (Webster et al., 2011).

A morfometria é um método quantitativo que descreve características geométricas de estruturas de várias dimensões (Meijer et al., 1997). Os métodos quantitativos são objetivos e reprodutíveis (Baak et al., 1985). Além disso, é considerado uma ferramenta útil e de baixo custo (Andrea et al., 2008).

Na patologia, esse método pode ser utilizado para se obter dados dos componentes celulares e teciduais com maior precisão através da mensuração e contagem, facilitando o diagnóstico e prognóstico de neoplasias (Andrea et al., 2008). Diversos estudos demonstram a viabilidade da morfometria em prever prognósticos em neoplasias mamárias na medicina humana (Baak et al., 1985; kronqvist et al., 2002; Provenzano et al., 2006; Veta et al., 2012) e na veterinária (Simeonov et al., 2009; Sleenckx et al., 2014).

### **2.4. Matriz extracelular e o câncer de mama**

A matriz extracelular (MEC) tem um importante papel no desenvolvimento, função e homeostase das células eucariotas. Além de fornecer suporte físico para as células,

a MEC participa da regulação, desenvolvimento, separação e manutenção de tecidos e órgãos através da regulação dos fatores de crescimento e receptores, níveis de hidratação e o pH do ambiente local (Mouw et al., 2014).

A MEC é primeiramente formada por duas classes de macromoléculas: proteínas fibrosas (incluindo colágeno e elastina) e glicoproteínas (incluindo fibronectina, proteoglicanos e laminina) (Mouw et al., 2014).

O colágeno é a principal proteína da MEC e sua função é fornecer estrutura e resistência aos tecidos (Mecham, 1998). Atualmente são conhecidos 27 tipos de colágeno nos tecidos do organismo, codificados por 41 genes dispersos em pelo menos 14 cromossomos. O colágeno pode ser classificado em dois tipos principais: formadores de fibrila (tipo I, II e III) e os não fibrilares (tipo IV), sendo que o colágeno tipo I é o mais abundante e amplamente distribuído no corpo. Ele participa da formação de ossos, dentina, tendões, cápsulas de órgãos, derme entre outros tecidos (Junqueira e Carneiro, 2013).

A estrutura de todas as moléculas de colágeno é sua hélice tripla - uma hélice direita de três cadeias  $\alpha$ , cada uma das quais contém uma ou mais regiões caracterizadas por aminoácidos repetidos Gly-X-Y, onde X e Y podem ser qualquer aminoácido (Brodsky e Persikov, 2013).

No tecido mamário, a composição estrutural e molecular da MEC pode ser fisiologicamente modificada em alguns momentos como na gravidez, ciclo estral, puberdade, lactação e involução mamária (Lochter e Bissell, 1995). Essas alterações, que também podem ser chamadas de remodelações da MEC, ocorrem na membrana basal (MB) que é uma estrutura especializada composta por colágeno tipo IV, laminina e proteoglicanos com 0,2  $\mu\text{m}$  de espessura. A MB separa a camada de células basais e a epitelial luminal da MEC estromal circundante, composta principalmente por colágeno tipo I e células como os fibroblastos e adipócitos (Conklin e Keely, 2012; Lochter e Bissell, 1995). Além disso, a MB também compõe os vasos sanguíneos presentes no microambiente estromal (Robertson, 2016).

O microambiente tumoral estromal é formado principalmente por fibroblastos, adipócitos, capilares, pericítos, componentes imunes e nervos que se encontram circundados por grande quantidade de colágeno tipo I, sulfato de condroitina e

fibronectina. Essas estruturas podem ser alteradas na neoplasia mamária maligna (Franco et al., 2010; Robertson, 2016).

A densidade da mama normal pode variar conforme a sua composição e quantidade de gordura, estroma e epitélio tecidual. No exame de mamografia, a maior proporção de tecido glandular e estromal comparado ao tecido adiposo é relacionado ao maior risco de câncer de mama em mulheres (Macchetti e Marana, 2007). Acredita-se, que entre os componentes da MEC o aumento do colágeno fibrilar do tipo 1 esteja relacionado com a maior rigidez da mama normal e também no câncer de mama (Provenzano et al., 2008). Em um outro estudo realizado com densidade mamográfica, foi sugerido que o aumento da rigidez pode ser um fator de risco para o câncer de mama (Martin e Boyd, 2008).

As células epiteliais mamárias não malignas quando expostas ao aumento da densidade de colágeno tipo I e aumento da rigidez da MEC, sofrem alterações na estrutura celular e aumento da proliferação (Paszek et al., 2005). Em um estudo realizado com modelos murinos demonstrou que o colágeno I (fibrilar) induz fenótipos celulares consistentes com um comportamento invasivo em células tumorais mamárias (Maller et al., 2013).

Estudos com câncer de mama humano, evidenciaram que a densidade, o realinhamento e o endireitamento do colágeno têm sido associados à invasão do tumor, metástases e pior prognóstico (Conklin e Keely, 2012; Provenzano et al., 2006). Segundo Provenzano e colaboradores (2008), o colágeno tipo I pode ser considerado como um biomarcador potencial em câncer de mama com metástase para o pulmão.

Da mesma forma, os estudos sobre o ambiente tumoral estromal vêm sendo desenvolvidos na medicina veterinária, com resultados semelhantes aos encontrados nos estudos do câncer de mama humano. Em dois estudos recentes, um com cadelas e outro com gatas com carcinomas mamários a ausência de definição do limite tumor-estromal e o aumento da largura das fibras de colágeno tipo I foram relacionadas com baixa sobrevida, independente da graduação da neoplasia e fatores de risco (Case et al., 2017; Rosen et al., 2020). Estes resultados demonstram que o colágeno pode ser um biomarcador prognóstico e apoiam o uso,

principalmente de cães, como modelo translacional para interações tumor-estroma no câncer de mama (Case et al., 2017).

### **2.5. *Picrosirius red***

O colágeno pode ser avaliado ou quantificado por diferentes técnicas, como imunohistoquímica, microscopia confocal, reação em cadeia polimerase (PCR) e colorações histoquímicas: tricrômio de Masson, *picrosirius red*, coloração de Weigert-van Gieson, Verhoeff (Coelho et al., 2018).

O estudo histoquímico do colágeno com a coloração de *picrosirius red* em luz polarizada, também chamado de método de *Picrosirius red*/polarização (PR/P), tem contribuído para a identificação e conhecimento da função do colágeno em diversos tecidos (Montes, 1996). A coloração especial de *Picrosirius red* tem a capacidade de aumentar a birrefringência natural do colágeno quando exposto à luz polarizada. O colágeno tipo I exibe uma coloração amarelo-avermelhada, enquanto o tipo III exibe a coloração verde (Montes, 1996).

Essa técnica vem sendo utilizada em estudos recentes na medicina humana e veterinária na área oncológica e tem sido considerada um biomarcador prognóstico em potencial nos carcinomas de células escamosas, carcinomas prostáticos e mastocitomas em cães (Bedoya et al., 2016; Calderón et al., 2019; Daniel et al., 2019), ameloblastomas em humanos (Haripriya et al., 2019), entre outros estudos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Comitê de ética**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV) sob o processo de número 24/2020.

### **3.2. Materiais dos pacientes**

Foram selecionadas 30 amostras de glândula mamária em blocos de parafina de cadelas com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Destes, foram excluídos quatro casos da pesquisa: dois casos por apresentarem outras neoplasias malignas no momento do diagnóstico e em outros

dois casos não havia material suficiente para as análises propostas na pesquisa. Diante disto, foram incluídos 26 casos de carcinomas mamários. As amostras teciduais foram provenientes de cadelas naturalmente acometidas por neoplasia mamária, atendidas no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFV para diagnóstico e tratamento.

O critério para inclusão destes materiais no estudo é que o animal tenha sido previamente submetido ao procedimento de radiografia torácica em três projeções (lateral direita, lateral esquerda e ventro-dorsal) no pré-cirúrgico, com a finalidade de avaliar a presença ou ausência de metástases pulmonares. Para verificar os resultados das radiografias destes animais, foram revisados os laudos dos arquivos do setor de Radiologia do Departamento de Veterinária da UFV.

Ademais, as amostras de tecidos nos blocos de parafina e as lâminas de microscopia que apresentavam qualidade adequada para avaliação histopatológica e morfométrica.

### **3.3. Análise histopatológica**

Os blocos de parafina com carcinoma mamário foram cortados no micrótomo com espessura de 3-6 $\mu$ m e corados com a coloração de hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e, pela coloração histoquímica de *Picrossirius Red* para observação de fibras de colágeno tipo I e III.

Os cortes histológicos corados em HE foram examinados por microscopia óptica por um único médico veterinário com treinamento em patologia veterinária para evitar variabilidade na interpretação histológica entre observadores (Santos et al., 2014; Santos et al., 2015). As neoplasias foram classificadas de acordo com os critérios histopatológicos da organização mundial da saúde (Owen, 1980) e critérios atuais (Cassali et al., 2020) para neoplasias mamárias caninas e foram graduadas de acordo com o sistema de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1991). Os cães que apresentaram múltiplas neoplasias mamárias primárias, foi selecionada a amostra de maior graduação histopatológica para a análise.

Foram incluídas na pesquisa apenas neoplasias mamárias classificadas como carcinomas mamários, incluindo os tipos: carcinoma em tumor misto (14), carcinoma

papilar (4), carcinoma tubular (2), carcinosarcoma (2), carcinoma micropapilar (1), adenomioepitelioma maligno (2) e carcinoma lobular pleomórfico (1).

Após a classificação e graduação das neoplasias mamárias, estas foram separadas em dois grupos, sendo o grupo metastático (MT) composto por 16 amostras de carcinomas mamários com metástase pulmonar (10 carcinomas mamários e 6 carcinomas do tipo especiais) e o grupo não metastático (NMT) composto por 10 carcinomas mamários sem metástase pulmonar. O grupo dos carcinomas especiais foi selecionado somente para a análise dos colágenos tipo I e III.

Em função das diversas classificações histopatológicas dos carcinomas mamários, foram realizadas as análises propostas, somente nas neoplasias classificadas como carcinomas em tumor misto (n=14) para verificar a influência da classificação neoplásica em relação a presença ou ausência de metástase pulmonar e nas variáveis analisadas.

Na análise histopatológica dos carcinomas mamários dos grupos MT e NMT foram avaliadas a contagem mitótica, as áreas de necrose e infiltrado inflamatório. A contagem mitótica foi realizada em 10 campos no aumento de 400x nas áreas mais celulares e periféricas da neoplasia (Peña et al., 2013).

As áreas de necrose foram avaliadas quanto a presença ou ausência e intensidade em todo o tecido tumoral. A intensidade foi classificada como discreta (1-33% de necrose), moderada (34-66%) e acentuada (67-100%).

O infiltrado inflamatório foi avaliado quanto a presença e ausência e classificado de acordo com a intensidade, adaptado de Estrela-Lima (2010). A intensidade foi classificada como discreta (1-3 focos inflamatórios), moderada (>3 focos inflamatórios) e acentuada (células inflamatórias difusamente distribuídas no tecido tumoral).

### **3.4. Análise morfométrica**

Foram realizadas fotomicrografias dos cortes histológicos em HE com câmera Leica MC170 HD (Leica Microsystems AG, Industry Division, Heerbrugg -Suíça) e o programa de captura de imagens LAS (Versão 4.12.0, Leica Microsystems - Suíça) conectado a um microscópio de luz Leica DM1000.

Na análise morfométrica das lâminas histológicas de carcinomas mamários foram caracterizadas, a área e o diâmetro maior e menor do núcleo, a proporção de células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório das áreas mais celularizadas da neoplasia, necrose, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e quantificação do colágeno tipo I e III dos grupos MT e NMT.

As medições dos núcleos das células carcinomatosas foram realizadas nas áreas mais celularizadas da neoplasia, geralmente na região periférica do tumor. Em cada campo foram selecionados núcleos de carcinomas mamários com bordas nucleares bem definidas e sem sobreposição dos núcleos. A morfometria dos núcleos foi realizada com medições para determinar a área e os diâmetros utilizando o programa image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Os núcleos das células neoplásicas foram mensurados em 10 campos no aumento de 1000x, método adaptado de kronqvist et al., (2002).

Com a técnica de morfometria de planimetria por contagem de pontos, foi avaliada a proporção das células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório das áreas mais celularizadas da neoplasia, e para este fim, foram realizadas 10 fotomicrografias, sobrepondo uma gráticula de 391 pontos no *software ImageJ*, desenvolvido pelo *National Institute of Health* (Maryland, EUA), disponível gratuitamente online (<https://imagej.nih.gov/ij>). De cada lâmina foram amostrados aleatoriamente dez campos histológicos em aumento de 200x para determinar as proporções, adaptado de Baak et al. (1985).

Os parâmetros estereológicos de densidade volumétrica (Vv) foram calculados pela contagem de pontos que ocorreram nas estruturas de interesse usando a razão:  $Vv = (PP / PT) \times 100$ , em que PP é o número de pontos ocorrendo sobre a estrutura de interesse e PT é o total número de pontos da grade (Gonçalves et al., 2010; Novaes et al., 2014; Sarandy et al., 2017).

Para a análise do colágeno, as lâminas foram coradas pela técnica do *Picrosirius red* para a diferenciação do colágeno tipo I e tipo III e examinadas com microscópio óptico sob luz polarizada (Olympus BX-53 ®, Japão) do Laboratório de Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. Foram realizadas fotomicrografias em 10 campos histológicos no aumento de 40x de maneira aleatória. A observação das fibras

colágenas com este método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I (birrefringência laranja amarelado a laranja e vermelho) e tipo III (birrefringência verde ou verde amarelo). Posteriormente foram analisadas com o software Image J com o *plug-in Threshold Colour*, obtendo-se o percentual de colágeno através da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor, baseado na metodologia de Bedoya et al. (2016) e Coelho et al. (2018) (Figura 1).

Para que não ocorra interferência na análise digital do colágeno nas neoplasias, não foram considerados os campos com ausência de células tumorais como regiões da derme e regiões ricas em artérias. Os dados obtidos foram exportados e salvos em planilha eletrônica (Excel 2013) para sua organização e análise estatística. A captura das imagens e a análise morfométrica foram realizadas por um único avaliador.

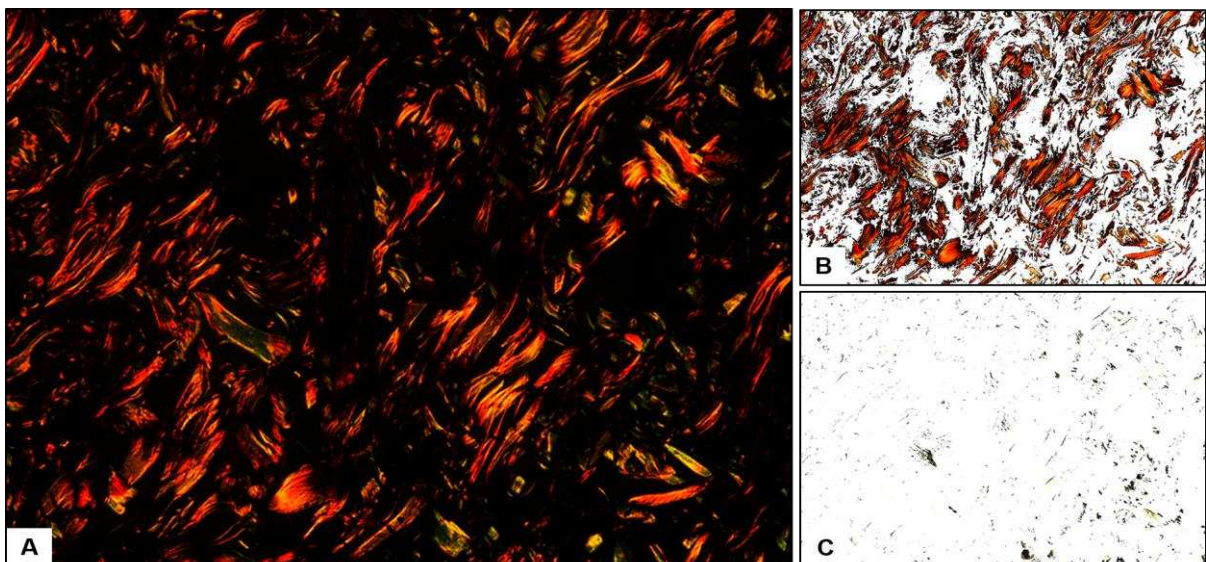


Figura 3. Fotomicrografia com a técnica PR/P dos colágenos tipo I e III na derme da região da glândula mamária mensurados com o software *Image J* usando o *plug-in Threshold Colour*. A. Colágeno tipo I e III observados com luz polarizada. B. Segmentação do colágeno tipo I exibindo coloração laranja amarelado e vermelho. C. Segmentação do colágeno tipo III exibindo coloração verde.

### 3.5 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o *Statistical Analysis System (SAS University)*. Os dados quantitativos (índice mitótico, mensuração nuclear, quantificação de colágeno tipo I e III, densidade volumétrica das células carcinomatosas, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e necrose) foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, para verificação de normalidade dos erros e

homogeneidade de variâncias, respectivamente. As variáveis em percentuais foram submetidas à transformação angular ( $y' = \arcsen\sqrt{y}$ ). Os dados foram, então, submetidos à análise de variância (*GLM Procedure*), de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + G_j + (MG)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que:  $Y_{ijk}$ , resposta observada;  $\mu$ , constante geral;  $M_i$ , efeito referente ao grupo de Metástase;  $G_j$ , efeito referente ao Grau;  $(MG)_{ij}$ , interação;  $e_{ijk}$ , erro aleatório.

As médias (*LS-means*) foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. As variáveis qualitativas (avaliações histopatológicas do infiltrado inflamatório e necrose) foram arranjadas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de Freeman-Halton. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise histopatológica

Na análise da contagem mitótica nos carcinomas mamários não houve diferença significativa entre os grupos MT e NMT ( $p > 0.05$ ) (Figura 4A). Em relação ao grau, houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) com aumento gradual do número de mitoses em função do grau, com menor média de mitoses no grau I e maior no grau III, independente do grupo (Figura 4B). Nos carcinomas em tumor misto foram observados resultados semelhantes com o aumento do índice mitótico em função do aumento do grau em neoplasias dos graus II e III ( $p < 0.05$ ) (Figura 5).

Na análise histopatológica da necrose não foram observadas diferenças significativas entre os carcinomas mamários em função dos grupos MT e NMT (Figura 6A) ( $p > 0.05$ ), porém, houve diferença significativa com intensidade moderada a acentuada da frequência de necrose em função do grau (Figura 6B), sendo maior em neoplasias de grau III ( $p < 0.05$ ). Nos carcinomas em tumor misto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e os graus ( $p > 0.05$ ) (Figura 7).

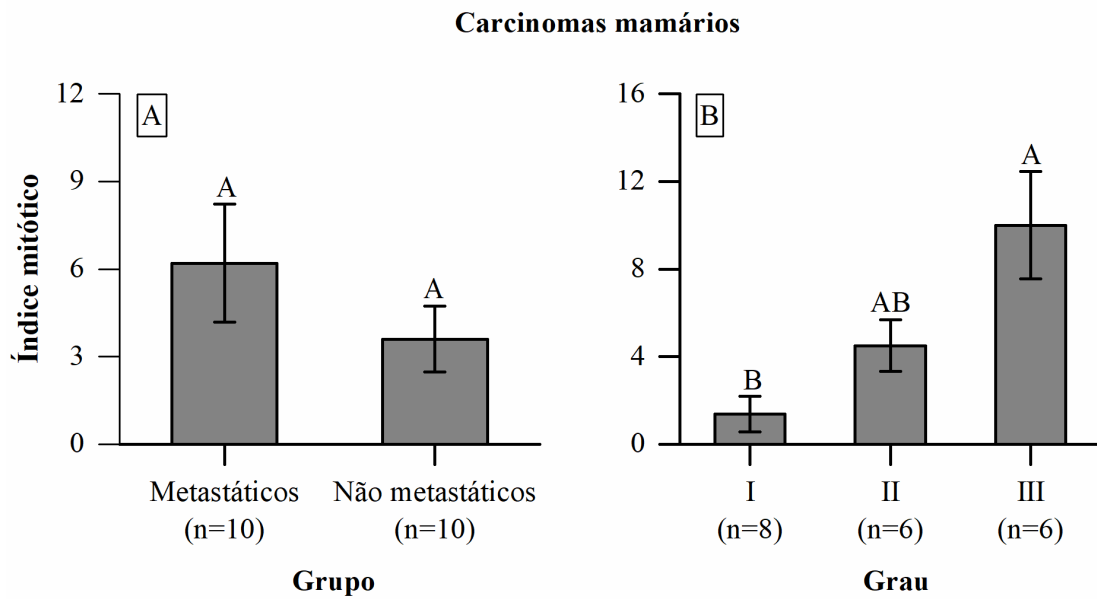


Figura 4. Representação gráfica da contagem mitótica nos carcinomas mamários. A. índice mitótico de acordo com o grupo. B. Índice mitótico de acordo com o grau. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

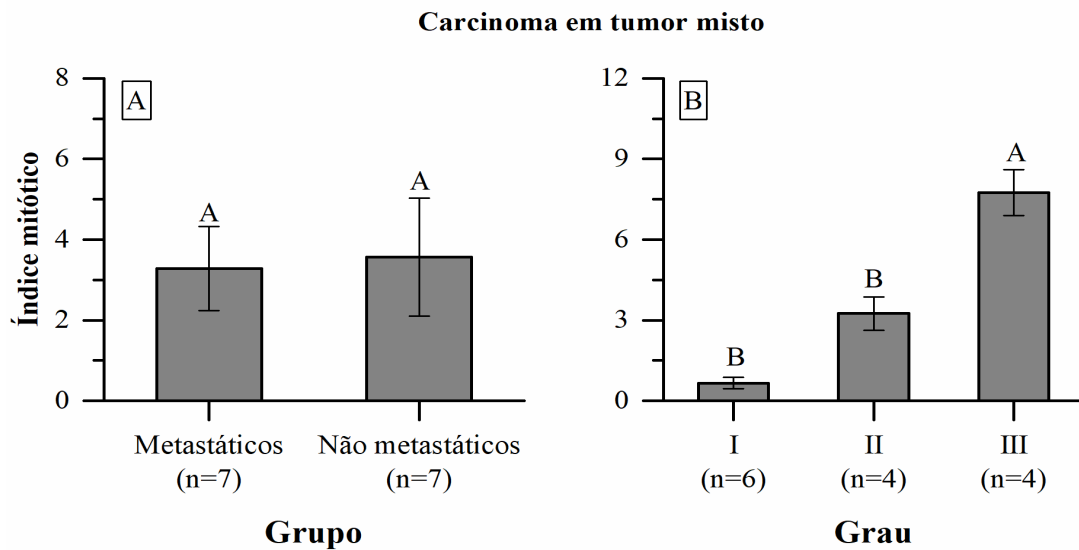


Figura 5. Representação gráfica da contagem mitótica nos carcinomas em tumor misto. A. Índice mitótico de acordo com o grau. B. Índice mitótico de acordo com o grupo. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

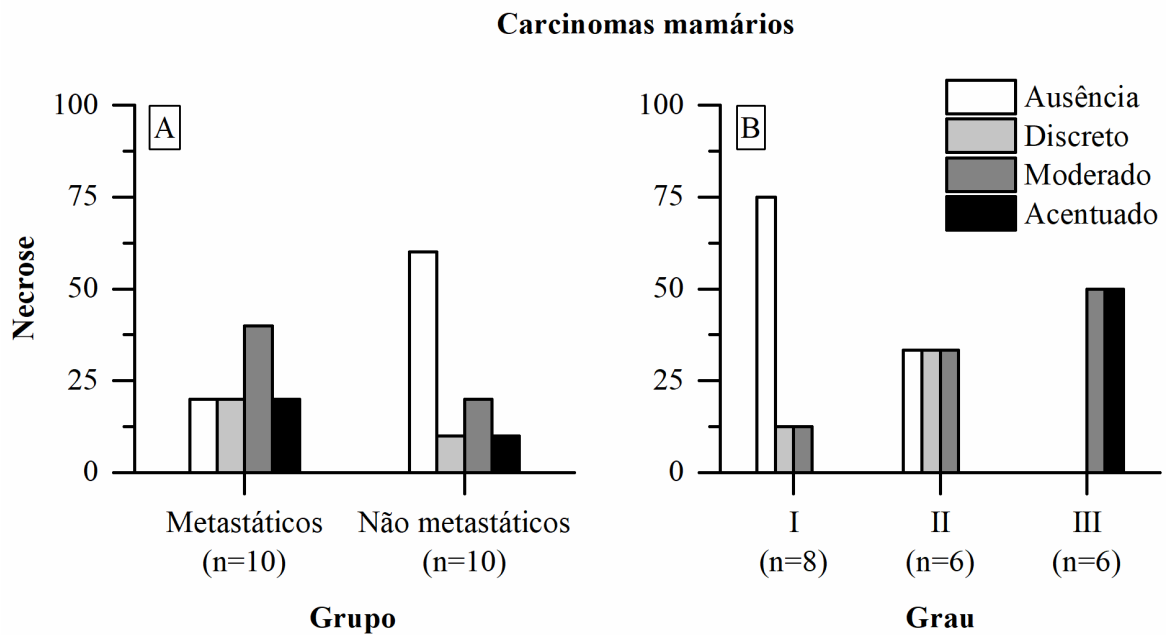


Figura 6. Representação gráfica da intensidade da necrose nos carcinomas mamários. A. Intensidade da necrose de acordo com o grupo. B. Intensidade da necrose de acordo com o grau. Médias com diferenças significativas pelo teste de Freeman-Halton ( $p < 0.05$ ).

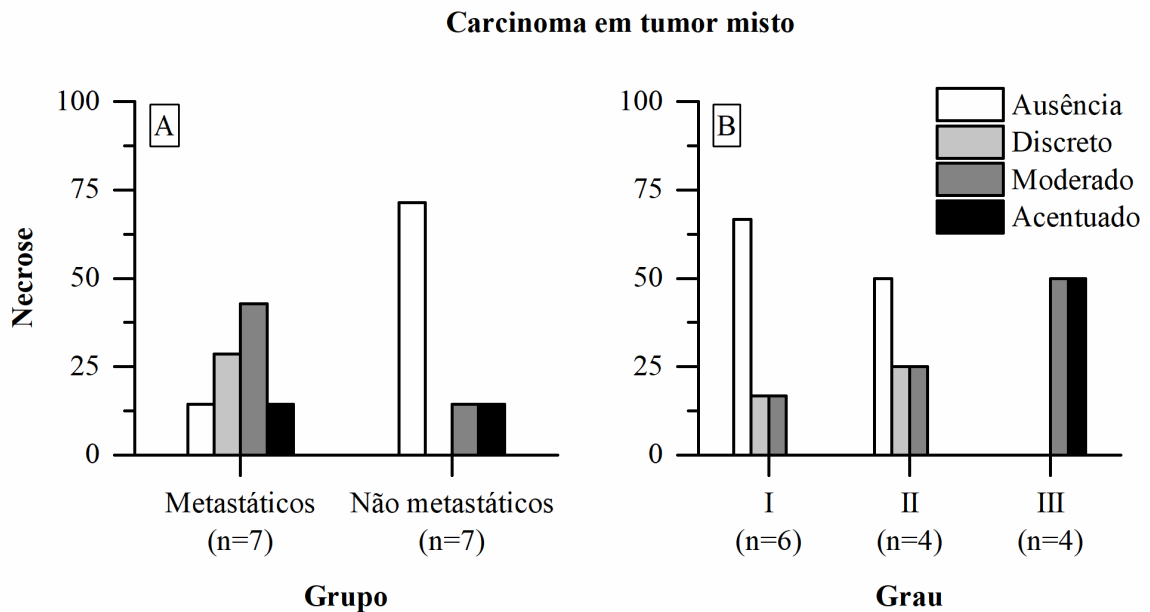


Figura 7. Representação gráfica da Intensidade da necrose nos carcinomas em tumor misto. A. Intensidade da necrose de acordo com o grupo. B. Intensidade da necrose de acordo com o grau. ( $p > 0.05$ )

Em relação a análise histopatológica do infiltrado inflamatório, estes foram observados em intensidade discreta em neoplasias de grau I e II e moderado em neoplasias de grau III. Porém não houve diferença significativa ( $p > 0.05$ ) em relação

ao grupo e ao grau tanto nos carcinomas mamários como nos carcinomas em tumor misto (Figuras 8 e 9).

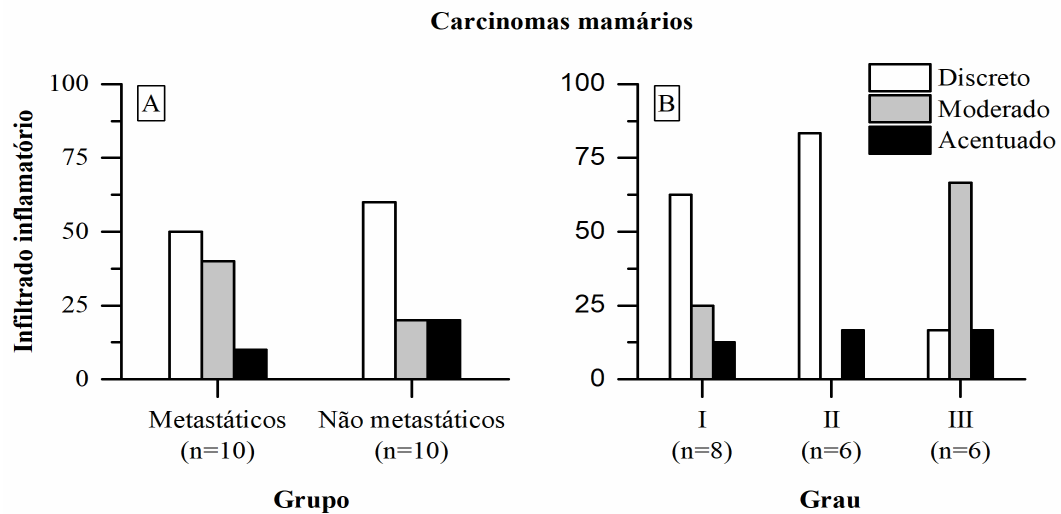


Figura 8. Representação gráfica da intensidade do infiltrado inflamatório nos carcinomas mamários. A. Intensidade da do infiltrado inflamatório de acordo com o grupo. B. Intensidade de infiltrado inflamatório de acordo com o grau. ( $p>0.05$ )

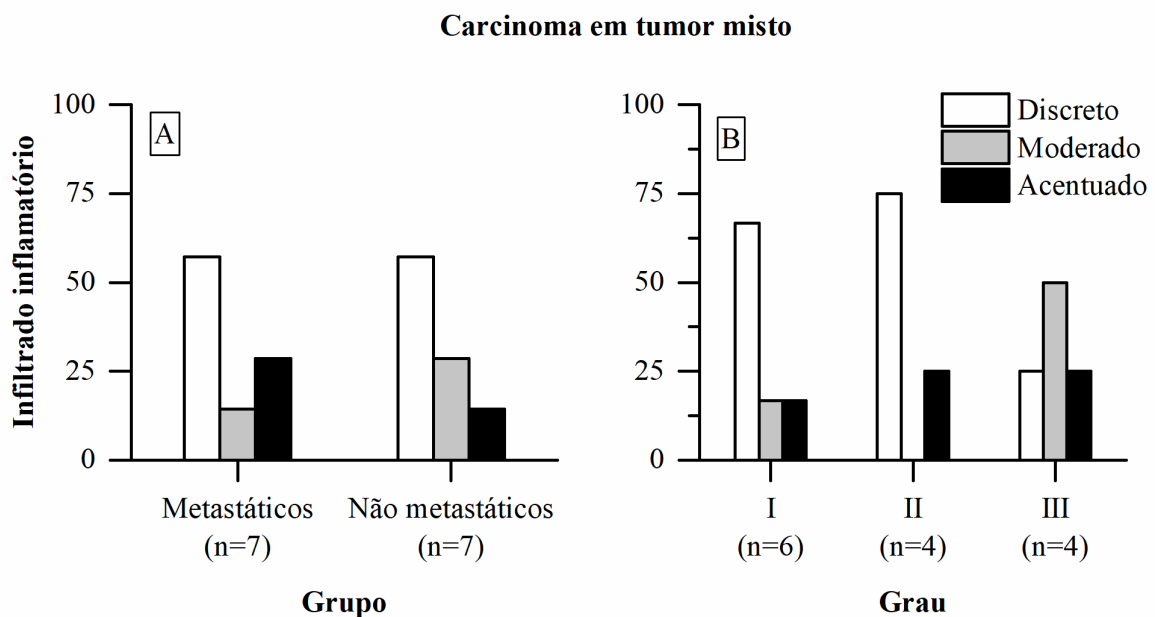


Figura 9. Representação gráfica da intensidade do infiltrado inflamatório nos carcinomas em tumor misto. A. Intensidade do infiltrado inflamatório de acordo com o grupo. D. Intensidade de infiltrado inflamatório de acordo com o grau. ( $p>0.05$ )

## 4.2 Análise morfométrica

Nos carcinomas mamários avaliados ocorreu um predomínio do colágeno tipo I, contudo a concentração dos colágenos tipo I e tipo III não foram influenciadas pela ocorrência de metástase. Também não houve diferenças significativas em relação

ao grau da neoplasia na quantificação dos colágenos I e III ( $p>0.05$ ) (Figuras 11 e 13). Ao analisar os colágenos dos carcinomas em tumor misto houve aumento do colágeno tipo I em neoplasias de grau I e redução em neoplasias de grau III independente do grupo (Figura 9B) e não houve diferenças significativas na concentração do colágeno tipo III em relação ao grupo e grau (Figura 12) ( $p>0.05$ ).

Na avaliação dos colágenos tipo I e III da MEC dos carcinomas mamários por PR/P foram observadas áreas com linearização, fragmentação e desorganização das fibras colágenas principalmente nas regiões ao redor das neoplasias (Figura 10).

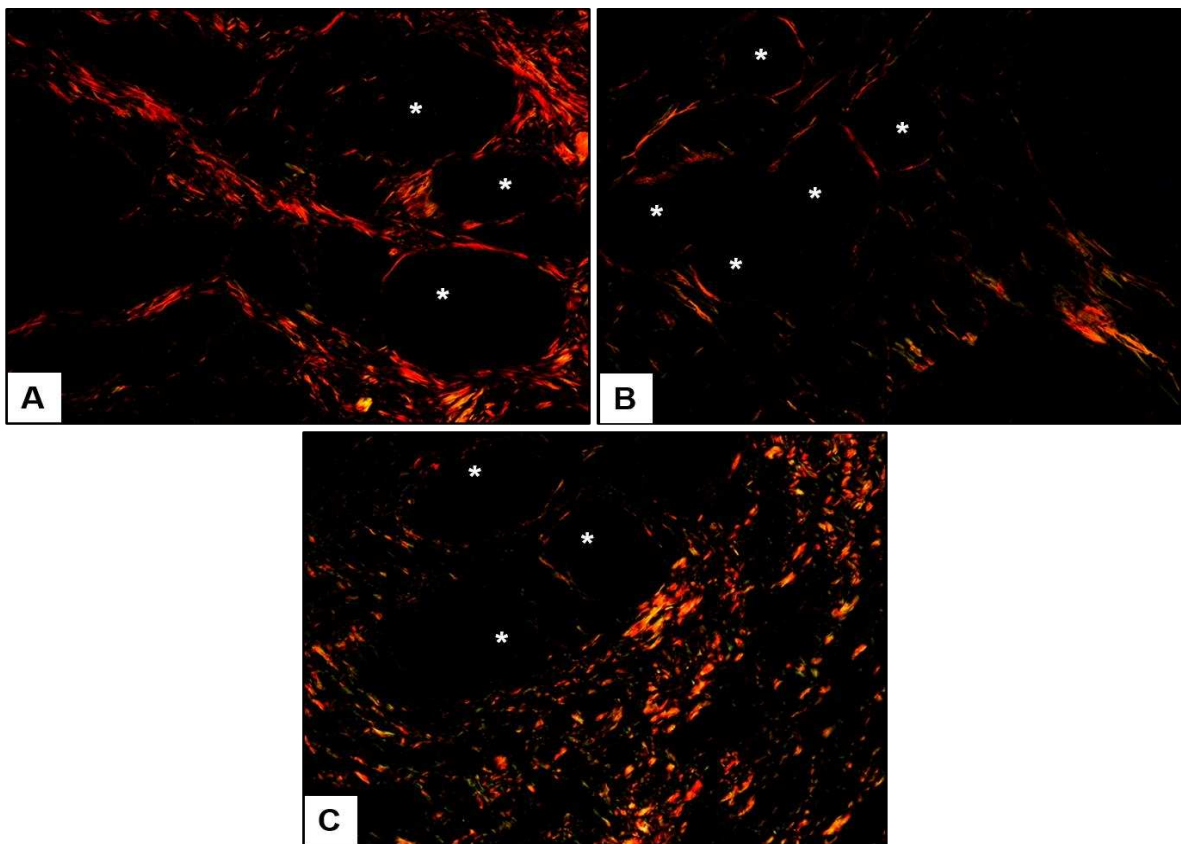


Figura 10. Fotomicrografias com a técnica de PR/P dos colágenos tipo I e III nos carcinomas mamários. A. Carcinoma mamário grau I (asteriscos) com fibras lineares de colágeno tipo I e escassas de colágeno tipo III. B. Carcinoma mamário grau II (asteriscos) com fibras lineares e desorganizadas de colágeno tipo I e tipo III. C. Carcinoma mamário grau III (asteriscos) com colágeno tipo I e III mais fragmentados e desorganizados.

### Carcinomas mamários

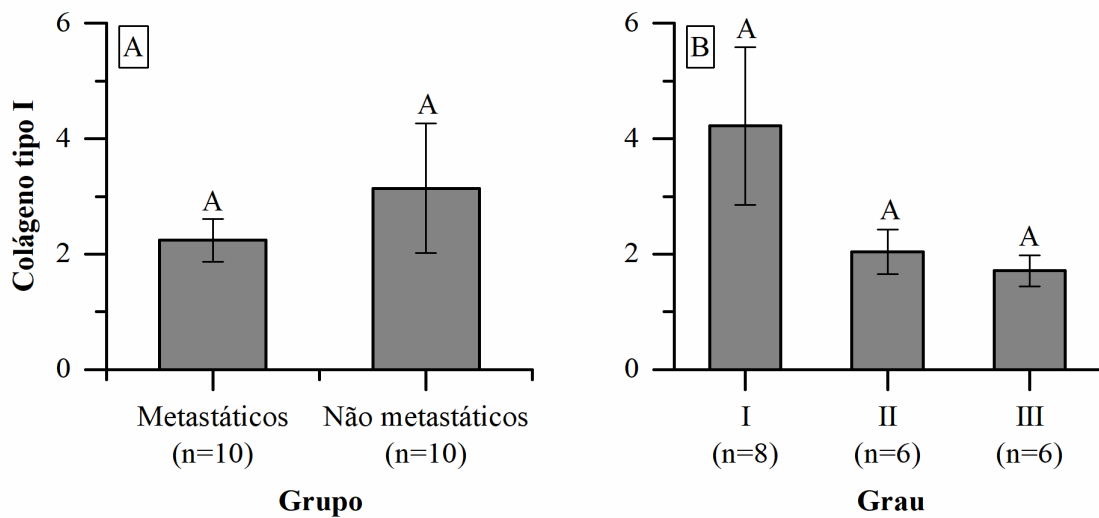


Figura 11. Representação gráfica da porcentagem do colágeno tipo I mensurado nos carcinomas mamários. A. Colágeno tipo I mensurado de acordo com o grupo. B. Colágeno tipo I mensurado de acordo com o grau. ( $p>0.05$ )

### Carcinoma em tumor misto

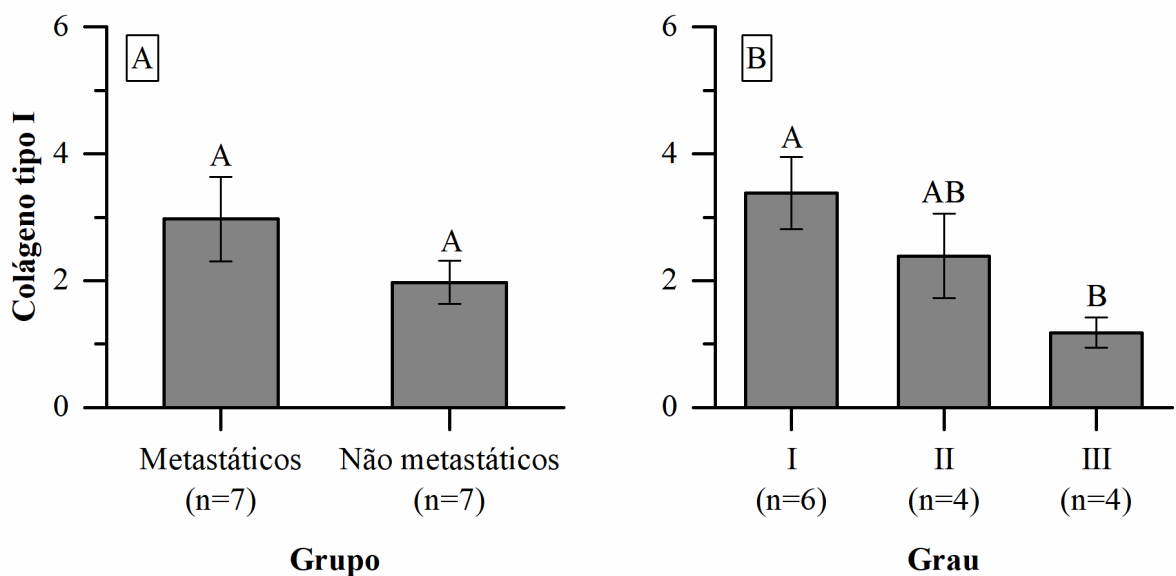


Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de colágeno tipo I mensurado nos carcinomas em tumor misto. A. Colágeno tipo I mensurado de acordo com o grupo. D. Colágeno tipo I mensurado de acordo com o grau. Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p<0.05$ ).



menor) e área e não foram observadas diferenças significativas em relação aos grupos e aos graus nos carcinomas mamários ( $p>0.05$ ) (tabela 4).

Nos carcinomas em tumor misto, houve uma relação significativa entre os núcleos com diâmetros maiores e a ausência de metástases ( $p<0.05$ ) (Tabela 5). No entanto não houve diferença significativa em relação ao grau ( $p>0.05$ ) (Tabela 6)

Tabela 4. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas mamários (média  $\pm$  erro-padrão) ( $p>0.05$ ).

<b>Variáveis</b>	<b>Metastático (n=10)</b>	<b>Não metastático (n=10)</b>
<b>Grau I (n=8)</b>		
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	6.73 $\pm$ 0.15	7.28 $\pm$ 0.38
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	5.10 $\pm$ 0.18	5.45 $\pm$ 0.29
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	5.92 $\pm$ 0.16	6.36 $\pm$ 0.33
Razão ( $\mu\text{m}$ )	1.34 $\pm$ 0.019	1.35 $\pm$ 0.01
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	28.6 $\pm$ 1.63	31.8 $\pm$ 3.17
<b>Grau II (n=6)</b>		
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	6.73 $\pm$ 0.15	7.05 $\pm$ 0.47
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	5.10 $\pm$ 0.18	5.21 $\pm$ 0.34
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	5.92 $\pm$ 0.16	6.13 $\pm$ 0.40
Razão ( $\mu\text{m}$ )	1.34 $\pm$ 0.019	1.37 $\pm$ 0.003
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	28.6 $\pm$ 1.63	29.34 $\pm$ 3.36
<b>Grau III (n=6)</b>		
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	6.66 $\pm$ 0.08	7.06 $\pm$ 0.16
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	5.09 $\pm$ 0.07	5.20 $\pm$ 0.22
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	5.88 $\pm$ 0.07	6.13 $\pm$ 0.19
Razão ( $\mu\text{m}$ )	1.32 $\pm$ 0.02	1.37 $\pm$ 0.03
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	27.73 $\pm$ 0.46	29.34 $\pm$ 3.36

Tabela 5. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas em tumor misto em relação ao grupo (média  $\pm$  erro-padrão) ( $p < 0.05$ ).

Variáveis	Metastático (n=7)	Não metastático (n=7)
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	6.63 $\pm$ 0.05b	7.13 $\pm$ 0.19a
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	4.95 $\pm$ 0.06a	5.28 $\pm$ 0.17a
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	5.79 $\pm$ 0.05a	6.20 $\pm$ 0.18a
Razão ( $\mu\text{m}$ )	1.35 $\pm$ 0.01a	1.37 $\pm$ 0.01a
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	27.3 $\pm$ 0.42a	30.2 $\pm$ 1.50a

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Tabela 6. Diâmetros, razão e área mensurados nos núcleos dos carcinomas em tumor misto em relação ao grau (média  $\pm$  erro-padrão) ( $p > 0.05$ ).

Variáveis	Grau I (n=6)	Grau II (n=4)	Grau III (n=4)
Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	6.81 $\pm$ 0.21	7.08 $\pm$ 0.25	6.78 $\pm$ 0.09
Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	5.11 $\pm$ 0.18	5.23 $\pm$ 0.21	5.01 $\pm$ 0.07
Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	5.96 $\pm$ 0.20	6.15 $\pm$ 0.23	5.89 $\pm$ 0.07
Razão ( $\mu\text{m}$ )	1.35 $\pm$ 0.01	1.35 $\pm$ 0.02	1.37 $\pm$ 0.02
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	28.44 $\pm$ 1.67	30.0 $\pm$ 1.67	28.07 $\pm$ 0.57

Na análise da morfometria por contagem de pontos foram avaliadas a proporção de células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório das áreas mais celularizadas da neoplasia, porém não houve diferenças significativas em relação aos grupos e os graus para os carcinomas mamários ( $p < 0.05$ ) (tabela 7). Nos carcinomas em tumor misto também não foram observadas diferenças significativas em relação aos grupos e os graus ( $p > 0.05$ ) (tabela 8).

Tabela 7. Porcentagens da densidade volumétrica nos carcinomas mamários para as células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório em relação aos grupos e graus (média  $\pm$  erro padrão).

Variáveis	Grupos					
	Metastáticos (n=10)			Não metastáticos (n=10)		
	I (n=8)	II (n=6)	III (n=6)	I (n=8)	II (n=6)	III (n=6)
Células neoplásicas	27.5% $\pm$ 6.14%	28.7% $\pm$ 8.03%	24.4% $\pm$ 1.01%	20.0% $\pm$ 3.60%	25.0% $\pm$ 5.66%	22.2% $\pm$ 3.53%
Vasos Sanguíneos	1.3% $\pm$ 0.63%	0.30% $\pm$ 0.18%	0.70% $\pm$ 0.40%	1.40% $\pm$ 1.10%	0.29% $\pm$ 0.13%	0.71% $\pm$ 0.14%
Necrose	0.62% $\pm$ 0.30%	0.44% $\pm$ 0.44%	0.00%	0.05% $\pm$ 0.05%	0.23% $\pm$ 0.18%	0.13% $\pm$ 0.13%
Infiltrado inflamatório	0.25% $\pm$ 0.71%	1.51% $\pm$ 1.1%	0.26% $\pm$ 0.16%	1.49% $\pm$ 0.45%	0.47% $\pm$ 0.28%	0.73% $\pm$ 0.52%

(p>0.05)

Tabela 8. Porcentagens da densidade volumétrica nos carcinomas em tumor misto para as células neoplásicas, vasos sanguíneos, necrose e infiltrado inflamatório em relação aos grupos e graus (média  $\pm$  erro padrão).

Variáveis	Grupos					
	Metastáticos (n=7)			Não metastáticos (n=7)		
	I (n=3)	II (n=2)	III (n=2)	I (n=3)	II (n=2)	III (n=2)
Células neoplásicas	21.98% $\pm$ 3.60%	20.76% $\pm$ 0.48%	14.4% $\pm$ 2.54%	21.17 $\pm$ 4.91%	19.92% $\pm$ 0.89%	18.7% $\pm$ 0.62%
Vasos Sanguíneos	1.56% $\pm$ 0.84%	0.37% $\pm$ 0.29%	0.30% $\pm$ 0.02%	1.95% $\pm$ 1.33%	0.21% $\pm$ 0.19%	0.58% $\pm$ 0.12%
Necrose	0.76% $\pm$ 0.38%	0.66% $\pm$ 0.66%	0%	0.06% $\pm$ 0.06%	0.05% $\pm$ 0.05%	0.20% $\pm$ 0.20%
Infiltrado inflamatório	3.03% $\pm$ 0.77%	2.27% $\pm$ 1.43%	0.11% $\pm$ 0.11%	1.49% $\pm$ 0.63%	0.71% $\pm$ 0.25%	0.90% $\pm$ 0.85%

(p>0.05)

## 5. DISCUSSÃO

Os carcinomas mamários são frequentes em cadelas e o diagnóstico é muito importante para determinar o prognóstico e o tratamento. No entanto, para se ter um melhor prognóstico é necessária a avaliação criteriosa das características da neoplasia como o tipo histológico e a graduação. Neste estudo, todas estas características foram avaliadas e as neoplasias mamárias foram graduadas de acordo com sistema Elston e Elis (1991).

Diferentes métodos permitem a análise da proliferação celular de uma neoplasia mamária, como a citometria de fluxo, avaliações morfológicas nucleares e de cromatina, regiões organizadores de nucléolo (NOR) e a imunistoquímica nuclear (Dutra, et al., 2008; Ferreira, et al., 2017). No entanto, a contagem mitótica é considerada um método mais simples e viável, reconhecidamente útil e de baixo custo para aplicação na rotina de diagnóstico. O índice mitótico na avaliação histopatológica do carcinoma mamário corresponde a um importante critério de avaliação na graduação, pois além de determinar comportamento biológico, pode auxiliar nas opções de tratamento quimioterápico e determinar o potencial de malignidade (Dutra, et al., 2008; Ferreira, et al., 2017). Cavalcanti, 2006 relatou menor tempo de sobrevivência em animais com carcinomas mamários com alto índice mitótico, independente dos outros critérios de graduação (formação tubular e pleomorfismo nuclear) (Cavalcanti, 2006). No presente estudo o índice mitótico obteve uma relação significativa com as neoplasias de grau III tanto em neoplasias metastáticas e não metastáticas. Resultado semelhante foi descrito por Dutra, et al. (2008) em um estudo com métodos de avaliação de proliferação celular em cadelas com carcinoma mamário, onde obteve-se uma relação positiva da contagem mitótica com o aumento do grau da neoplasia mamária e na determinação de fatores prognósticos.

Além do índice mitótico, áreas de necrose distribuídas dentro da neoplasia mamária maligna também podem ser relacionadas com maior malignidade (Zappulli et al., 2019). A necrose ocorre devido ao rápido crescimento da neoplasia maligna com redução do aporte nutricional pelos vasos sanguíneos (Newkirk, et al., 2017). Embora não esteja incluída nos critérios da graduação elaborados por Elston e Elis (1991) para os carcinomas mamários, esta lesão é considerada uma importante

característica de malignidade na avaliação histopatológica de diversos tumores, incluindo as neoplasias mamárias (Goldschmidt et al., 2011; Zappulli et al., 2019). Tal fato, corrobora com os resultados do presente estudo onde houve um aumento significativo da intensidade da necrose em neoplasias de alto grau em carcinomas metastáticos e não metastáticos.

O sistema imunológico tem um importante papel no desenvolvimento das neoplasias tanto em humanos como em animais. Estudos com histologia e citometria de fluxo demonstram que as neoplasias mamárias são infiltradas por diversos tipos de células do sistema imune, que incluem linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos (Estrela-Lima et al., 2017). Há evidências que o tipo, a intensidade, a localização do infiltrado inflamatório na neoplasia e a ação de citocinas podem influenciar na resposta inibitória ou promotora do crescimento tumoral (Estrela-Lima et al., 2017). Neste estudo não foram realizados exames moleculares como a citometria de fluxo, para a diferenciação dos tipos de células linfoides, sendo assim não seria possível de definir o papel dessas células nas neoplasias avaliadas, porém pela avaliação histopatológica foi possível determinar que a intensidade do infiltrado inflamatório não influenciou na graduação e metástases, no entanto, em todas as neoplasias avaliadas foram encontrados infiltrados inflamatórios em diferentes intensidades.

Na neoplasia mamária, a matriz extracelular está sendo constantemente remodelada. Durante a remodelação da MEC, ocorrem diversas alterações como a proteólise dos colágenos tipo I e IV por metaloproteinases e catepsinas com formação de fragmentos que são essenciais para a invasão e migração das células tumorais no tecido e vasos sanguíneos e linfáticos (Egeblad et al., 2010). Os fragmentos de colágeno tipo I podem agir como antagonistas pois não conseguem formar uma estrutura de colágeno completa e ao mesmo tempo podem facilitar a migração das células tumorais através da ativação de integrinas (Egeblad et al., 2010).

Ocorreu um predomínio do colágeno tipo I em todas as neoplasias mamárias avaliadas, contudo, no presente estudo, não houve um efeito significativo na presença de metástase e do grau da neoplasia nos valores deste colágeno. Na avaliação histopatológica com a utilização da técnica de *Pricossirius Red* com

polarização nos carcinomas mamários, foram observadas áreas com linearização, fragmentação e desorganização das fibras colágenas, principalmente nos carcinomas mamários de grau III. Semelhante ao encontrado no estudo realizado por Garcia et al., (2021), onde foi observado maior proporção de fibras de colágeno mais curtas em carcinomas mamários invasivos e que foram relacionados à menor taxa de sobrevivência em cadelas. Outros estudos com a avaliação do colágeno em neoplasias malignas de cães também observaram alterações nas fibras colágenas semelhantes com as encontradas no presente estudo (Bedoya et al., 2016; Martins et al., 2002).

Alguns fatores podem ter contribuído para a variabilidade observada nos valores dos colágenos tipo I e III, como as diferentes classificações e graduações. De forma que, ao avaliarmos os resultados dos carcinomas em tumor misto separados das demais classificações, ocorreu um efeito significativo do colágeno tipo I em relação ao grau, com maior média no grau I em relação ao III. Este resultado pode ser explicado pela presença de fibras de colágeno tipo I mais lineares e menos fragmentadas em relação as fibras colágenas das outras graduações observadas nos carcinomas em tumor misto do presente estudo. Este resultado é semelhante ao encontrado por Martins et al., (2002) onde foram observadas fibras colágenas mais regulares e organizadas em neoplasias mamárias bem diferenciadas.

Os colágenos tipo I e tipo III predominam na pele normal, representando respectivamente, 87% e 10% do colágeno dérmico (Miller *et al.*, 2013). Na matriz extracelular dos carcinomas mamários, a quantidade de colágeno tipo III pode variar de acordo a malignidade da neoplasia. Estudos com camundongos demonstraram menor expressão de colágeno tipo III quando associado com a agressividade tumoral (Brisson et al., 2015). No entanto, em estudos com humanos, houve um aumento da expressão deste colágeno de acordo com o aumento do grau da neoplasia mamária (Robertson, 2016). Estes estudos demonstram a variabilidade da concentração do colágeno tipo III na MEC dos carcinomas mamários, semelhante ao observado no presente estudo, que apesar de não ter um efeito significativo nos grupos, foi observada variadas concentrações deste colágeno nas neoplasias das diferentes graduações dos grupos metastáticos e não metastáticos.

Um dos critérios celulares de grande importância na avaliação da malignidade das neoplasias é o pleomorfismo nuclear (Ferreira et al., 2017). Na avaliação nuclear das neoplasias mamárias deve-se considerar o tamanho e a forma dos núcleos celulares, tendo como referência a célula mamária epitelial normal (Ferreira et al., 2017). Estudos com carcinoma mamário em humanos consideraram que a utilização da técnica de morfometria para mensuração nuclear pode fornecer prognósticos mais objetivos e precisos em comparação ao método de análise histopatológica convencional (Kronqvist et al., 2002; Ikpatt et al., 2002; Veta et al., 2012). No presente estudo, no grupo dos carcinomas em tumor misto, houve um aumento do diâmetro maior do núcleo em neoplasias não metastáticas, independente do grau. Este resultado pode ser explicado pois o carcinoma em tumor misto é uma neoplasia composta por células epiteliais cúbicas a colunares com diferentes graus de pleomorfismo nuclear (Goldschmidt, 2017; Ferreira, 2017).

O microambiente tumoral é formado por células neoplásicas, estroma, vasos sanguíneos, células inflamatórias associadas com outros variados componentes celulares (Whiteside, 2008). Os componentes do microambiente tumoral exercem uma importante função na interação entre a neoplasia e o estroma mamário que favorecem a progressão, proliferação, invasão e metástase (Franco et al., 2010). Neste estudo, foram avaliadas as áreas com maior densidade celular do carcinoma mamário e na mesma área foram analisadas as células inflamatórias, vasos sanguíneos e áreas de necrose, a fim de encontrar uma associação entre as células tumorais e estes componentes. Porém, não foram encontradas relações significativas entre estes componentes com a presença ou ausência da metástase e o grau da neoplasia.

## 6. CONCLUSÕES

- A intensidade da necrose e do índice mitótico podem ser relacionados com maior grau de malignidade nos carcinomas mamários na avaliação histopatológica.
- Houve predomínio do colágeno tipo I em todos os carcinomas mamários.
- Em carcinomas de tumor misto há maior proporção de colágeno tipo I em neoplasias de baixo grau.
- Os carcinomas em tumor misto não metastáticos podem ter núcleos com diâmetro maior em relação aos metastáticos.
- Estudos futuros com maior quantidade de amostras representativas de cada tipo histológico e graduação são recomendados para a determinação das características do carcinoma mamário canino, a sua relação com o microambiente tumoral e com a metástase pulmonar.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDREA, C. E. DE; BLEGGI-TORRES, L. F.; TERESA, M. A. D. S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 1, p. 51–57, 2008.
- BAAK J.P.A.; VAN DOP H.; KURVER P.H.J.; HERMANS J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**, v. 56, n. 2, p. 374–382, 1985.
- BEDOYA, S.A.O.; CONCEIÇÃO, L.G.; VILORIA, M.I.V.; LOURES, F.H.; VALENTE, F.L.; AMORIM, R.L.; SILVA, F.F. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 147–154, 2016.
- BRABRAND, A.; KARIUKI, I.I.; ENGSTROM, M.J.; HAUGEN, O.A.; DYRNES L.A.; ÅSVOLD B.O.; LILLED AHL, M.B.; BOFIN, A.M. Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. A premise for tumour invasiveness?. **Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, v. 123, n. 1, p. 1–8, jan. 2015.
- BRISSEON, B.K., MAULDIN, A.E.; LEI, W.; VOGEL, K.L.; POWER, M.A.; LO, A.; DOPKIN, D.; KHANNA, C.; WELLS, G.R.; PURÉ, E.; VOLK, W.S. Type III collagen directs stromal organization and limits metastasis in a murine model of breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 185 n.5, p.1471–1486, 2015.
- BRODSKY, B. B.; PERSIKOV, A. V. Molecular structure of the collagen triple helix. **Advances in protein chemistry**, v. 70, n. 04, p. 302–333, 2005.
- CALDERÓN L.G.R.; KOBAYASHI P.E.; VASCONCELOS R.O.; FONSECA-ALVES C.E.; LAUFER-AMORIM R. Characterization of Collagen Fibers (I, III, IV) and Elastin of Normal and Neoplastic Canine Prostatic Tissues. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 1, p. 22, 2 mar. 2019.
- CASE, A, BRISSEON, B.K.; DURHAM, A.C.; ROSEN, S.; MONSLOW, J.; BUZA, E.; SALAH. P.; GILLEM, J.; RUTHEL, G.; VELUVOLU, S.; KRISTIANSEN, V.; PURÉ, E.; BROWN, D.C.; SORENMO K.U.; VOLK, S.W. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–17, 6 jul. 2017.
- CASSALI, G.D.; JARK, P.C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; HORTA, R.S.; FIRMO, B.F.; SUEIRO, F.A.R.; RODRIGUES, L.C.S.; NAGAKI, K.Y.R. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n.3, p.555-574, 2020.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE. G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; ANGÉLICA, C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; KARINE, A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO J.B.; FERREIRA AMR, OLIVEIRA LO, MALM C, ZUCCARI DAPC, NEIDE M, RIBEIRO LR, CAMPOS LC, SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.C.; SCHUCH,

I.D.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.; SIMONE, C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L.Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; MICHELE, S.; ALMEIDA, E.C.P.; CAMPOS, C.B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153–180, 2011.

CAVALCANTI, M.F. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de Notthigham. Dissertação (mestrado). Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.106. 2006.

COELHO, P.G.B.; CONCEIÇÃO, L.G.; BEDOYA, S.A.O.; SOUZA, M.V.; VILORIA, M.I.V. Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 415–418, 2018.

CONKLIN, M. W.; KEELY, P. J. Why the stroma matters in breast cancer. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, n. 3, p. 249–260, 28 maio 2012.

DANIEL, J.; BARRA, C.N.; PULZ, L.H.; KLEEB, S.R.; XAVIER, J.G.; CATÃO-DIAS, J.L.; NISHIYA, A.T.; FUKUMASU, H.; STREFEZZI, R.F. Intratumoral collagen index predicts mortality and survival in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Dermatology**, p. 1–7, 28 abr. 2019.

DE NARDI A. B; FERREIRA T.M.M.R; ASSUNÇÃO K.A. Neoplasias mamárias. In: Daleck, C. R; De Nardi A. B. **Oncologia em cães e gatos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.p 726-749.

DORN, C.R.; TAYLOR D.O.; SCHNEIDER R.; HIBBARD, H.H.; KLAUBER, M.R.; Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda Country. **Journal of the National Cancer Institute**, v.40. p. 307–318. 1968.

DUTRA, A.P.; AZEVEDO JÚNIOR, G.M.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1403-1412, 2008.

EGEBLAD, M.; RASCH, M.G.; WEAVER, VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 697–706, 2010.

ELSTON, C. W.; ELLIS, O. 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**, v. 19, p. 403–410, 1991.

ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, R.G. Imunopatologia e o câncer de mama canino. In: Cassali.G.D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 125-130.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.; CARVALHO, A.T.; MELO, S.M.B.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO O.A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from

mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v.10 n.256, p.1-14, 2010.

FERREIRA, E.; BREGUNCI, G.C.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 105-109, 2003.

FERREIRA, E.; CAMPOS, M.R.A.; NAKAGAKI, K.Y.R.; CASSALI, G.D. Marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama. In: Cassali.G.D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 136-139.

FERREIRA, E.; NAKAGAKI, K.Y.R.; CASSALI, G.D. Graduação histológica do câncer de mama. In: Cassali.G.D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 141-142.

FRANCO, O.E.; SHAW, A.K.; STRAND, D.W.; HAYWARD, S.W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 33–39, 2010.

GAMBA, C.O.; FERREIRA, E.; SALGADO, B.S.; DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.A.; NAKAGAKI, K.Y.R.; CASSALI, G.D. Neoplasias Malignas. In: Cassali.G.D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 1-13.

Garcia, A. P.V.; Reis, L.A.; Nunes, F.C.; Longford F G. J.; Frey J.G.; Paula, A.M.; Cassali, G.D. Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**,v.11,p.5668, 2021.

GOLDSCHMIDT, M.H; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 25 jan. 2011.

GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI V. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumours in domestic animals**. 5 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, p.724. 2017.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S.; SMELSTOYS, J.A. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: Mohr U.; Carlton W.W.; Dungworth D.L.; et al. **Pathobiology of the Aging Dog**. eds. Iowa State University Press, Ames, IA. 2001. p.168–178.

GONÇALVES, R.V.; MEZÊNCIO, J. M. S.; BENEVIDES, G. P.; MATTA, S.L.P.; NEVES, C.A.; SARANDY, M.M.; VILELA, E.F. “Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in wistar rats,” **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n.4, p. 350–355, 2010.

GRAY, M.; MEEHAN, J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C.; KAY, C.; TURNBULL, AK.; MORRISON, L.R.; PANG, L.Y.; ARGYLE, D. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–17, 2020.

HAMPE J.F.; MISDORP W. Tumours and dysplasias of the mammary gland,. In: Bull. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. v.50, **World Health Organization**, Geneva. 1974. p.111-133.

- HARIPRIYA, P.; ANANTHANENI, A.; GUDURU, V.; HORATTI, P.; KIRESUR, M.; VARA, J. Collagen during odontogenesis and in ameloblastoma: A polarizing microscopic study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 23, n. 3, p. 474, 2019.
- IKPATT, O.F.; KUOPIO, T.; COLLAN, Y. Nuclear morphometry in African breast cancer. **Image Analysis & Stereology**, v.21, p. 145-150, 2002.
- INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer/ José Alencar Gomes da Silva**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. p. 34.
- ZORN, T.M.T. Tecido conjuntivo. In: JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO J. **Histologia básica**, 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.88-119
- KARNOUB, A.E.; DASH, A.B.; VO, A.P.; SULLIVAN, A.; BROOKS, M.W.; BELL, G.W.; RICHARDSON, A.L.; POLYAK, K.; TUBO, R.; WEINBERG, R.A. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 449, n. 7162, p. 557–563, 2007.
- KLEIN, B.G. The Mammary Gland. In: KLEIN, B.G. **Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology**,. 5. ed. St. Louis: Saunders, 2014. p.439-443.
- KORKAYA, H.; LIU, S.; WICHA, M. S. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 3804–3809, 3 out. 2011.
- KRONQVIST, P.; KUOPIO, T.; JALAVA, P.; COLLAN, Y. Morphometrical malignancy grading is a valuable prognostic factor in invasive ductal breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 11, p. 1275–1280, 2002.
- LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, p. 165–173, 1995.
- MACCHETTI, A. H.; MARANA, H. R. C. Densidade mamográfica como fator de risco para o câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 10, 2007.
- MALLER, O.; HANSEN, KC.; LYONS, T.R.; ACERBI, I.; WEAVER, V.M.; PREKERIS R, TAN AC, SCHEDIN P. Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. **Journal of Cell Science**, v. 126, p. 4108–4120, 2013.
- MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G.; FINOTELLO, R.; VERGANTI S.; VALENTI P.; CIARAMELLA L.; ZINI E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.235 p.967–972. 2009.
- MARTIN, L. J.; BOYD, N. F. Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: Hypotheses based on epidemiological evidence. **Breast Cancer Research**, v. 10, p. 1-14, 2008.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Histochemical study of fibrillar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p. 43-49, 2002.

- MECHAM, R. P. Overview of extracellular matrix. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 57, n. 1, p. 1–14, 1998.
- MEIJER, A.; BELIEN, J.A.M.; VAN DIEST, P.J.; BAAK, J.P.A. Image analysis in clinical. **Journal of Clinical Pathology**, v. 50, p. 365–370, 1997.
- MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 7th edith : Elsevier, 2013. P. 774 – 843.
- MISDORP, W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. **Acta Endocrinology** (Copenhagen). v.125, p.27–31. 1991.
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland In: Meuten D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Iowa State Press, Ames, 2002, p.575-606.
- MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15–27, 1996.
- MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: A multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 2014.
- NEWKIRK, K.M.; BRANNICK, E.M.; KUSEWITT, D.N. Neoplasia and Tumor Biology. In: Zachary, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 6 ed, St. Louis: Elsevier, 2017, p 291.
- NOGUEIRA, J.C.; CASTRO, C.S. Morfologia das glândulas mamárias de cadelas. In: Cassali.G.D. **Patologia mamária canina: do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Medvet, 2017. p. 1-13.
- NOVAES, R. D.; GONCALVES, R. V.; CUPERTINO, M. C.; ARAÚJO, B.M.; REZENDE, R.M.; SANTOS,E.C.; LEITE,J.P.; MATT, S.L.P. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention, **International Journal of Experimental Pathology**, v. 95, n. 2, p. 138–146, 2014.
- NUNES, F.C.; CAMPOS, C.B.; TEIXEIRA, S.V.; BERTAGNOLLI, A.C.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.
- OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.
- OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organization**, p. 1–52, 1980.
- PASZEK, M.J.; ZAHIR, N.; JOHNSON, K.R.; LAKINS, J.N.; ROZENBERG, G.I.; GEFEN, A.; REINHART-KING, C.A.; MARGULIES, S.S.; DEMBO, M.; BOETTIGER, D.; HAMMER, D.A.; WEAVER, V.M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 241–254, 2005.
- PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P.J.; CLEMENTE, M.; CUESTA P.; PÉREZ-ALENZA, M.D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary

carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**. v. 50. p. 94–105, 2013.

PEREIRA, C.T.; MARQUES, F.L.N., WILLIAMS, J.; DE MARTIN, B. W.; BOMBONATO, P.P. 99MTC-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs, **Veterinary Radiology & Ultrasound**. v.49. p.487–491, 2008.

PEREZ ALENZA, M.D.; RUTTEMAN, G.R.; PEÑA, L.; BEYNEN A.C.; CUESTA, P. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.12 p.132–139. 1998.

PEREZ ALENZA, M.D.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.219. p.1110–1114. 2001.

PROVENZANO, P.P.; ELICEIRI, K.W.; CAMPBELL, J.M.; INMAN, D.R.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v. 4, n. 38, p. 1–16, 2006.

PROVENZANO, P.P.; INMAN, D.R.; ELICEIRI, K.W.; KNITTEL, J.G.; YAN, L.; RUEDEN, C.T.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1–15, 2008.

REESE S.; BUDRAS K.-D.; MÜLLING CHR.; BRAGULLA H.; KÖNIG H. E. Tegumento comum. In: König H.E.; Liebich, H.G. **Anatomia dos animais domésticos. Texto e atlas colorido**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p.615-667.

RIZWAN, A.; BULTE, C.; KALAICHELVAN, A.; CHENG, M.; KRISHNAMACHARY, B.; BHUJWALLA, Z.M.; JIANG, L.; GLUNDE, K. Metastatic breast cancer cells in lymph nodes increase nodal collagen density. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–6, 2015.

ROBERTSON, C. The extracellular matrix in breast cancer predicts prognosis through composition, splicing, and crosslinking. **Experimental Cell Research**. v. 343, p. 73-81, 2016

ROSEN, S.; BRISSON, B.K.; DURHAM, A.C.; MUNROE, C.M.; MCNEILL, C.J.; STEFANOVSKI, D.; SORENMO, K.U.; VOLK, S.W. Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. **Plos one**, v. 15, n. 8, p. 1–22, 2020.

SANTOS, M.; CORREIA-GOMES, C.; MARCOS, R.; SANTOS, A.; DE MATOS, A.; LOPES, C.; PEREIRA, P.D. Value of the Nottingham Histological Grading Parameters and Nottingham Prognostic Index in Canine Mammary Carcinoma. **Anticancer research**, v. 35, n.7, p.4219–27, 2015.

SANTOS, M.; CORREIA-GOMES, C.; SANTOS, A.; DE MATOS, A.; ROCHA, E.; LOPES, C.; PEREIRA, P.D. Nuclear pleomorphism: role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. **Veterinary Journal**, v. 200, n.3 p. 426–33, 2014.

SARANDY. M.M.; NOVAES, R.D.; XAVIER, A.A.; VITAL, C.E.; LEITE, JP.V.; MELO, F.C. S.; GONÇALVES, R.V. Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. **BioMed Research International**. v. 201, p. 1-11, 2017.

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR D.O. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**. v.431, p.249–1261, 1969.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Nuclear cytomorphometry in feline mammary gland epithelial tumours. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 296–300, 2009.

SLEECKX, N.; VAN BRANTEGEM, L.; VAN DEN EYNDEN, G.; FRANSENX, E.; CASTELEYN, C.; VAN CRUCHTEN, S.; VELDHUIS KROEZE, E.; VAN GINNEKEN, C. Angiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. **Journal of Comparative Pathology**, v.150, p. 175-183, 2014.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K.U.; WORLEY D. R.; ZAPPULLI V. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW AND MACEWEN'S **Small Animal Clinical Oncology**. 6 ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. p. 604.

SOULTANI, C.; PATSIKAS, M.N.; KARAYANNOPOULOU, M. JAKOVLJEVIC, S.; CHRYSOGONIDIS, I.; PAPAIOANNOU N.; PAPADOPOULOU, P.; PAVLIDOU, K.; ILIA M., KAITZIS D.G.; ILIA T.M. Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomographic indirect lymphography. **Veterinary Radiology & Ultrasound**. v.58, p.186–196, 2017.

VETA, M.; KORNEGOOR, R.; HUISMAN A.; VERSCHUUR-MAES, A.H.J.; VIERGEVER M.A.; PLUIM, J.P.W.; VAN DIEST, P.J. Prognostic value of automatically extracted nuclear morphometric features in whole slide images of male breast cancer. **Modern Pathology**, v. 25, p.1559–1565, 2012.

WEBSTER, J.D.; 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.; NORTHRUP, N.C.; SARLI, G.; SCASE, T.; SORENMO, K.; SCHULMAN, F.Y.; SHOIEB, AM.; SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; TESKE, E.; THAMM, D.H.; VALLI, V.E.; VERNAU, W.; VON EULER, H.; WITHROW, S.J.; WEISBRODE, S.E.; YAGER, J.; KIUPEL, M. Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 7–18, 2011.

WHITESIDE, TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, p. 5904–5912, 2008.

ZAPPULLI, V.; PEÑNA, L.; RASOTTO, R.; GOLDSCHMIDT, M.H.; GAMA, A.; SCRUGGS, J.; KIUPEL, M. Mammary tumors. In: Kiupel, M. **Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals**, 4 ed , v.2, Davis-Thompson Foundation, Gurnee. 2019.

ZATLOUKAL, J.; LORENZOVÁ, J.; TICHÝ, F.; NEČAS, A.; KECOVÁ, H.; KOHOUT, P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. **Acta Veterinaria Brno**, v. 74, n. 1, p. 103–109, 2005.