

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS - CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE TECIDUAL E SUA
CORRELAÇÃO COM A MALIGNIDADE EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

**Gabriela Noronha de Toledo
Médica Veterinária**

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS - CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA FIBROSE TECIDUAL E SUA
CORRELAÇÃO COM A MALIGNIDADE EM
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINA**

Gabriela Noronha de Toledo

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano

Coorientador: Profa. Dra. Geórgia Modé Magalhães

Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (área de Clínica Médica).

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

2017

Toledo, Gabriela Noronha
T649a Avaliação da fibrose tecidual e correlação com a malignidade em neoplasias mamárias caninas / Gabriela Noronha de Toledo. -- Jaboticabal, 2017
lxiii, 63 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano
Banca examinadora: Paola de Castro Moraes, Pamela Reina Rogrigues Moreira, Thiago Demarchi Munhoz, Adriana Coelho de Souza

Bibliografia

1. Glândula mamária. 2. Histopatologia. 3. Oncologia veterinária.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA FIBROSE TECIDUAL E SUA CORRELAÇÃO COM A MALIGNIDADE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

AUTORA: GABRIELA NORONHA DE TOLEDO

ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORIENTADORA: GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES

COORIENTADOR: RICARDO ANDRES RAMIREZ USCATEGUI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia / BA


Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ
Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto, SP


Pós-doutoranda PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. ADRIANA COELHO DE SOUZA
Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 07 de março de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Noronha de Toledo – Filha de Rommel Ricardo Alves de Toledo e Maria Teresinha de Noronha Toledo nasceu em 16 de dezembro de 1980, em Franca, São Paulo, onde cursou ensino fundamental e médio, concluído em dezembro de 1998. Em 2000, após aprovação no vestibular, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade de Franca - UNIFRAN, onde se graduou Médica Veterinária em dezembro de 2004. No ano de 2006, após seleção, ingressou no Programa de Residência em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica de Pequenos Animais, da Universidade de Marília – UNIMAR, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Bonini Abreu dos Santos. Obteve o título de especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais em fevereiro de 2008. Em agosto de 2010, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (mestrado), área de concentração Patologia Animal no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP – Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes. Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (doutorado), área de concentração Clínica Médica no Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP – Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano. Em setembro de 2013, ingressou no curso de pós-graduação *latu sensu* em Oncologia Veterinária. Obteve o título de especialista em Oncologia Veterinária em setembro de 2015.

DEDICATÓRIA

À Deus que me guiou, iluminou e me deu forças para que continuasse a busca naquilo que almejei.

À minha família, meus queridos pais, Rommel e Teresinha e meu irmão Daniel, pelo amor constante, pela intensa dedicação, pelo apoio e por caminharem ao meu lado, sempre.

À minha avó, Maria Clara (*in memorian*), pelo exemplo de vida. Obrigada por todos os ensinamentos, por ter cuidado de mim e por sempre me inspirar. É inevitável que a saudade passe, mas você jamais sairá do meu coração.

Ao meu amado e estimado cão Pluto (*in memorian*), amigo fiel e companheiro por toda vida. Inspirador e motivador desta especialidade fantástica que é a Oncologia Veterinária.

Aos pacientes do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV) que me ensinaram a cada dia um pouco mais sobre amor e vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcus Antônio Rossi Feliciano, pela oportunidade e confiança ao aceitar esta orientação e possibilitar a concretização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Aos professores Geórgia Modé Magalhães e Ricardo Andres Ramirez Uscategui que gentilmente aceitaram a coorientação deste trabalho.

A querida amiga Pamela Rodrigues Reina Moreira que vem caminhando junto comigo desde a residência em Marília. Obrigada por todo o auxílio nos anos de pós graduação, pela amizade e por todos os outros momentos em que me ajudou. Minha eterna gratidão.

Especialmente ao colega Giovanni Vargas Hernandez, pela cumplicidade, ajuda e dedicação sempre que precisei.

Aos queridos amigos de Franca, sempre presentes na minha vida e que vem acompanhando minha trajetória desde a adolescência.

Aos queridos amigos que fiz em Jaboticabal: as minhas amigas e companheiras da república Casa da Bia: Gabriella Marcondes Dobashi Hirata, Gabriela Cristina Zoccal Volpato, Bruna Piva Maria. Aos meninos da república Nazarena: Gustavo Oda, Fabio Nelson Gava, Bruno Watanabe Minto, Thiago Demarchi Munhoz, Marcelo Augusto Koury, Maurício Durante Christofolletti e Sandra Oliveira, pessoas com as quais passei muitos momentos especiais da minha vida. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelo apoio em momentos difíceis e também pelos momentos divertidos que estarão para sempre na minha memória.

Aos colegas da pós-graduação do SOV, as residentes do Setor de Diagnóstico por Imagem pela participação direta ou indireta no atendimento de pacientes oncológicos, nos diversos momentos em que me ajudaram, em que trocamos informações e conhecimento, esclarecemos dúvidas sempre buscando o bem-estar dos nossos pacientes oncológicos, pelas sugestões feitas ou simplesmente quando conversamos pelo Departamento.

Aos amigos que não foram mencionados, mas que participaram indiretamente na realização deste projeto e tiveram grande importância.

Aos professores responsáveis do SOV: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa e Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional no atendimento de pacientes oncológicos.

A Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi pela oportunidade de realizar o estágio de docência na disciplina de Histologia Básica.

À banca examinadora que esteve presente no Exame Geral de Qualificação: Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans, Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado e Prof. Dr. Fábio Nelson Gava.

À banca examinadora que esteve presente na Defesa de Tese De Doutorado: Prof. Dr. Thiago Demarchi Munhoz, Profa. Dra. Pamela Rodrigues Reina Moreira, Profa. Dra. Paola de Castro Moraes e Profa. Dra. Adriana Coelho.

Aos demais professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária pela ajuda e aprendizado e momentos agradáveis proporcionados durante a realização do Doutorado.

Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pelo acolhimento e auxílio durante o doutorado.

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

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica) por ter me acolhido.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo.

OBRIGADA!



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 023705/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Elastografia, ultrassonografia com contraste por microbolhas e Doppler como métodos de diagnóstico das neoplasias mamárias, afecções prostáticas e testiculares em cães"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de novembro de 2012.

Jaboticabal, 08 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E QUADROS	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Neoplasias Mamárias em Cadelas.....	02
2.2 Classificação das Neoplasias Mamárias.....	04
2.3 Neoplasias Mamárias Benignas.....	04
2.4 Neoplasias Mamárias Malignas.....	07
2.5 Grau Histopatológico.....	11
2.6 Interações Entre o Tumor e o Estroma.....	12
2.7 Fibrose Tecidual.....	14
3. HIPÓTESE.....	18
4. OBJETIVOS	18
4.1 Geral	18
4.2 Específicos.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 Grupos Experimentais	19
5.2 Diagnóstico Histopatológico das Neoplasias Mamárias.....	19
5.3 Avaliação da Fibrose Tecidual.....	20
5.4. Análise Estatística	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS.....	37
APÊNDICE A.....	45

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Resumo da graduação histopatológica nas neoplasias mamárias proposto por Elston e Ellis 1998).....	12
Tabela 1: Frequência absoluta e relativa (%) da idade de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	21
Tabela 2: Frequência absoluta e relativa (%) das raças de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	22
Tabela 3: Frequência absoluta e relativa (%) da localização dos nódulos nas cadeias mamárias direita e esquerda de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	23
Tabela 4: Frequência absoluta e relativa (%) do tamanho dos nódulos de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	24
Tabela 5: Frequência absoluta e relativa (%) de neoplasias mamárias em cadelas de com acordo o diagnóstico histopatológico segundo a classificação de Misdorp et al. (1999) nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	26
Tabela 6: Frequência absoluta e relativa (%) do grau histopatológico das neoplasias mamárias em cadelas de com acordo o diagnóstico histopatológico segundo a classificação de Elston e Ellis (1998) nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	28
Tabela 7: Frequência absoluta e relativa (%) da classificação de fibrose das neoplasias mamárias em cadelas nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.....	29
Tabela 8: Mediana \pm IQR dos valores de fibrose tecidual (%) encontrados nas neoplasias mamárias em cadelas em relação ao diagnóstico histopatológico, Jaboticabal/SP, 2016.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Interações entre o tumor e o estroma durante os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário ductal. **A:** tecido mamário normal, o epitélio ductal e a camada de células mioepiteliais estão separadas pela membrana basal do tecido conectivo circundante, MEC, capilares e fibroblastos. **B:** Carcinoma ductal *in situ*, o lúmen contém células displásicas. A parede do ducto torna-se irregular, camada de células mioepiteliais indistintas, podem ser observadas áreas da membrana basal intactas e alteradas. O tecido conectivo ao redor é caracterizado por deposição de MEC fibrilar e acúmulo de fibroblastos (KALIURI e ZEISBERG, 2006).....13

Figura 2: Interações entre o tumor e o estroma durante os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário ductal. **C:** Carcinoma ductal invasivo a membrana basal está rompida e as células tumorais formam áreas semelhantes ao ducto normal sem a definição da membrana basal. O estroma que circunda as células tumorais contém miofibroblastos, infiltrado inflamatório e formação de novos capilares sanguíneos. **D:** Carcinoma ductal avançado. As células tumorais formam arranjos em forma de cordões e há invasão do estroma fibroso (KALIURI e ZEISBERG, 2006).....14

Figura 3: A: Fibroblasto normal que são circundados pela MEC do tecido conjuntivo que consiste em grande quantidade de colágeno tipo I e fibronectina. Os fibroblasto interagem com o microambiente adjacente através das integrinas ($\alpha1\beta1$). Tipicamente, são células fusiformes com proeminente citoesqueleto de actina e filamentos intermediários de vimentina. Embora a detecção de fibroblastos seja desafiadora, os biomarcadores mais utilizados não são específicos para fibroblastos, a proteína 1 fibroblasto específica (FSP1) é específica para fibroblastos nos tecidos normais. **B:** fibroblasto que adquiriu fenótipo ativado e que está associado com o aumento da atividade proliferativa e da secreção de proteínas da MEC como colágeno tipo I, tenascina C, fibronectina que contém o domínio EDA e SPARC (proteína ácida secretora e rica em cisteína). Fibroblastos ativados são caracterizados por expressarem actina de músculo liso- α . Diversos fatores de crescimento, como TGF β e quimiocinas como a proteína quimiotáctica de monócitos 1 (MCP1) e proteases

de degradação de MEC mediam a ativação de fibroblastos. (KALLIURI e ZEISBERG, 2006).....16

Figura 4: Fotomicrografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela. **A:** Carcinoma em tumor misto (*), HE, barra 100 µm. **B:** Área de fibrose em carcinoma em tumor misto (*), TM, barra 100 µm. **C:** Carcinoma complexo (*), HE, barra 100 µm. **D:** Área de fibrose em carcinoma complexo (*), TM, barra 100 µm.....27

Figura 5: Fotomicrografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela. **A:** Carcinoma sólido (*), TM, barra 100 µm. **B:** Fotografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela através do programa Image-Pro Plus16. Área de fibrose marcada através do programa de imagem Image-Pro Plus 16 (*). **C** Análise da área de fibrose marcada (vermelho). **D:** Cálculo da área de fibrose moderada marcada (vermelho) e da coloração de fundo (amarelo). **E:** Resultado do cálculo automático da área de fibrose em carcinoma sólido.....32

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CGA: campo de grande aumento

FCAV: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FSP1: proteína 1 fibroblasto específica

G1: grupo 1

G2: grupo 2

HE: hematoxilina eosina

IFN: interferon

IFNY: interferon Y

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IQR: faixa interquartil

M1D, M1E: mama torácica cranial direita e esquerda

M2D, M2E: mama torácica caudal direita e esquerda

M3D, M3E: mama abdominal cranial direita e esquerda

M4D, M4E: mama abdominal caudal direita e esquerda

M5D, M5E: mama inguinal direita e esquerda

MCP1: proteína quimiotáctica de monócitos 1

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinases

µm: micrômetro

mm: milímetro

NK: células Natural Killer

NMU: N-Metil-N-Nitrosureia

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAS: ácido periódico de Schiff

SOV: Serviço de Oncologia Veterinária

SPARC: proteína ácida secretora rica em cisteína

SRD: sem raça definida

TM: tricômico de Masson

TGF β : fator de crescimento transformante- β

TNF α : fator de necrose tumoral α

VPP: valor preditivo positivo

VPN: valor preditivo negativo

AVALIAÇÃO DA FIBROSE TECIDUAL E CORRELAÇÃO COM A MALIGNIDADE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

RESUMO – As neoplasias mamárias em cadelas são as neoplasias mais comuns e metade dos tumores apresentam classificação histopatológica maligna no momento do diagnóstico. Objetivou-se neste estudo avaliar a fibrose tecidual e correlação com a malignidade nas neoplasias mamárias em cadelas. Foram selecionadas 85 amostras de nódulos mamários que foram divididos em Grupo 1: neoplasias mamárias benignas (n = 21); Grupo 2: neoplasias mamárias malignas (n = 64). Foram preparados cortes histopatológicos com hematoxilina e eosina e tricômio de Masson para visualização de tecido conjuntivo e avaliação de fibrose tecidual por meio da análise do programa Image ProPlus versão 4.5. Foi realizada análise estatística pelo teste de Kruskal Wallis, correlação pelo teste de Pearson e com o valor da mediana da porcentagem de fibrose nos tumores malignos foi testada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia do teste para diagnóstico de malignidade e relação entre a porcentagem de fibrose e probabilidade do diagnóstico ser maligno pela regressão logística binária com nível de significância de 5% para todos os testes. A idade mais frequente foi 10 anos e diversas raças foram encontradas com predomínio de fêmeas mestiças. As lesões mamárias não neoplásicas foram hiperplasia ductal (4) e lobular (6) e as neoplasias benignas foram: adenoma cístico (1), complexo (4) e tubular (2) e tumor misto benigno (4). As neoplasias malignas foram carcinoma complexo (7), de células escamosas (2), tubulopapilífero (18), sólido (13) *in situ* (3) e tumor misto maligno (21). O grau histopatológico mais frequente foi grau I (29) seguido do grau II (28) e III (7). A fibrose nas neoplasias mamárias malignas foi classificada como severa (45), moderada (14) e discreta (5). A análise estatística revelou diferença significativa ($p = 0.0284$) na porcentagem de fibrose em relação ao diagnóstico histopatológico das neoplasias mamárias. A mediana da porcentagem de fibrose nas neoplasias malignas foi de 58%. A prevalência foi de 75%, sensibilidade de 45%, especificidade de 86%, VPP de 90% e VPN de 34%. A verossimilidade positiva foi de 94%, a negativa foi de 24% e a acurácia do teste foi de 38%. Por meio da regressão logística binária estimou-se que a porcentagem de fibrose é preditiva da malignidade das neoplasias mamárias em 46% ($p = 0,074$). Concluiu-se que embora os dados revelados neste estudo não tenham certificado que a fibrose tecidual adjacente indica malignidade das neoplasias mamárias por si só, a presença de fibrose pode ser considerada notável como parâmetro de prognóstico histológico para as neoplasias mamárias em cadelas.

Palavras-chave: glândula mamária, histopatologia, oncologia veterinária.

EVALUATION OF TISSUE FIBROSIS AND ITS CORRELATION WITH MALIGNANT BREAST NEOPLASMS IN BITCHES

ABSTRACT – Breast neoplasms in bitches are the most common neoplasms and half of the tumors present malignant histopathological classification at the time of diagnosis. The objective of this study was to evaluate tissue fibrosis and the correlation with malignancy in mammary neoplasms in bitches. It was selected 85 samples of mammary nodules that were divided into Group 1: benign mammary neoplasms (n = 21); Group 2: malignant breast neoplasms (n = 64). Histopathological sections were prepared with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome for the visualization of connective tissue and assessment of tissue fibrosis through the analysis of the Image ProPlus version 4.5 program. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test, Pearson test correlation and the median percentage of fibrosis in malignant tumors. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, test accuracy for malignancy diagnosis and relation between the percentage of fibrosis and the probability of diagnosis being malignant were tested by binary logistic regression with significance level of 5% for all tests. The most frequent age was 10 years and several races were found with predominance of mixed females. Non-neoplastic mammary lesions were ductal (4) and lobular hyperplasia (6) and benign neoplasms were: cystic (1), complex (4) and tubular (2) adenoma and benign mixed tumor (4). Malignant neoplasms were complex (7), squamous (2), tubulopapillary (18), solid (13) *in situ* carcinoma (3) and malignant mixed tumor (21). The most frequent histopathological grade was grade I (29) followed by grade II (28) and III (7). Fibrosis in malignant breast neoplasms was classified as severe (45), moderate (14), and discrete (5). Statistical analysis revealed a significant difference ($p = 0.0284$) in the percentage of fibrosis in relation to the histopathological diagnosis of breast neoplasms. The median percentage of fibrosis in malignant neoplasms was 58%. Prevalence was 75%, sensitivity 45%, specificity 86%, PPV 90% and NPV 34%. The positive verossimility was 94%, the negative was 24% and the accuracy of the test was 38%. By means of binary logistic regression it was estimated that the percentage of fibrosis is predictive of the malignancy of mammary neoplasms in 46% ($p = 0.074$). It was concluded that although the data revealed in this study did not certify that adjacent tissue fibrosis indicates malignancy of mammary neoplasms by itself, the presence of fibrosis can be considered as a parameter of histological prognosis for breast neoplasms in bitches.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias correspondem às neoplasias mais prevalentes em cadelas intactas e aproximadamente 40 a 50% dos tumores apresentam classificações histopatológicas malignas (SOREMO, 2003; CASSALLI et al., 2014; VISAN et al., 2016). Tais neoplasias possuem comportamento biológico variável e as metástases em locais distantes são causas comuns de morte dos pacientes (KLOPFLEISCH et al., 2010; SANTOS et al., 2013). Assim, estas lesões mamárias caninas têm sido foco de intensa investigação por oncologistas e patologistas veterinários nas últimas décadas (PEÑA et al., 2014).

Ademais, as neoplasias mamárias na espécie canina servem como modelo animal relevante para estudo dos tumores mamários em mulheres (JENSEN-JAROLIM et al., 2015) e as semelhanças e diferenças nas alterações moleculares, quando comparadas as espécie canina e humana, adquirem interesse crescente (KLOPFLEISCH et al., 2011; VISAN et al., 2016).

Durante o ciclo do desenvolvimento, a glândula mamária exhibe diversas propriedades associadas às neoplasias mamárias e vários fatores de crescimento relacionados ao estroma. Estes fatores, além de necessários para o desenvolvimento mamário, podem tanto promover quanto evitar a evolução do processo neoplásico. Deste modo, as células do estroma mamário desempenham papel importante na oncogênese e tal fato deve ser reconhecido (BRYONY et al., 2002).

Estudos realizados nas áreas de genética e biologia celular indicam que o crescimento neoplásico não é determinado apenas pelas células neoplásicas malignas em si, mas também pelo estroma tumoral. As células que estão presentes na resposta à lesão inflamatória crônica e na angiogênese, tais como células endoteliais e fibroblastos, também estão presentes nas neoplasias exercendo atividade relevante na progressão, crescimento e propagação de tumores, porém, a contribuição estrutural e funcional dos fibroblastos associados às células tumorais, que está presente em todas as fases da progressão neoplásica, ainda está sendo investigada. A produção de fatores de crescimento, quimiocinas e matriz extracelular (MEC) facilitam o recrutamento de células endoteliais. Os fibroblastos e a sua

respectiva função são, portanto, fatores determinantes para a progressão neoplásica maligna e representam importante alvo terapêutico (KALLIURI e ZEISBERG, 2006).

As interações entre os miofibroblastos e o seu microambiente devem ser exploradas, não só para caracterizar novos alvos terapêuticos e drogas capazes de prevenir ou tratar a evolução patológica, mas também para interferir nas alterações observadas durante este processo (KALLIURI e ZEISBERG, 2006).

A presente pesquisa objetivou dar continuidade aos estudos com biomarcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. Esta proposta fez parte do trabalho contínuo do grupo de pesquisa (processos Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP: bolsa de doutorado e auxílio pesquisa nº 2008/08180-0 e 2009/51195-0; e auxílio e bolsa Jovem Pesquisador nº 2012/16635-2 e 2013/06443-1) com produção científica pertinente graças ao apoio recebido por esta Instituição de Pesquisa.

Deste modo, o presente estudo teve como propósito avaliar a presença de fibrose nas neoplasias mamárias caninas, com a finalidade de proporcionar elementos que contribuam para o melhor entendimento do desenvolvimento neoplásico e com isso seja possível aperfeiçoar o prognóstico das neoplasias mamárias na espécie canina. Concomitantemente, estes resultados poderão ser comparados com os descritos em tumores mamários da mulher, quando se considera a fêmea canina como modelo animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias Mamárias em Cadelas

Os estudos sobre neoplasias espontâneas em animais domésticos são considerados promissores para esclarecer importantes questões da oncologia, com provável repercussão no estudo das neoplasias de seres humanos (ROWEL et al., 2011; PINHO et al., 2012, VISAN et al., 2016). A neoplasia mamária espontânea é considerada a mais prevalente nas fêmeas caninas e na mulher (MISDORP, 2002; ESTRELA-LIMA et al., 2010; KLOPFLEISCH et al., 2010; KLOPFLEISCH et al., 2011; SLEECKX et al., 2011; RANIERI et al., 2013; IM et al., 2014; BURRAI et al., 2015;

MELIN et al., 2016; VISAN et al., 2016). As características epidemiológicas, clínicas e biológicas dos tumores mamários em cadelas são semelhantes aos da espécie humana e por isso vêm sendo utilizados como modelo para o conhecimento de alguns aspectos da carcinogênese mamária em mulheres (RASOTTO et al., 2014; MELIN et al., 2016; VISAN et al., 2016).

A localização e incidência de diferentes tipos tumorais dependem de vários fatores, entre eles, idade, raça, sexo e localização geográfica (VISAN et al., 2016). Estima-se que no Brasil a ocorrência de tumores malignos varia entre 74,24% no estado de São Paulo (FIRMO, 2016), 68,4% no estado do Paraná (DE NARDI et al., 2002) e 73,4% no estado do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA - FILHO et al., 2010). A incidência na cadela é três vezes maior do que na mulher e existem algumas semelhanças moleculares e biológicas nas duas espécies (SHAFIEE et al., 2013; MELIN et al., 2016). Na espécie canina, a ocorrência aumenta em torno de 6 anos de idade, com picos em cadelas com idade de nove a 11 anos (GAMA et al., 2008; ESTRELA-LIMA et al., 2010; SHAFIEE et al., 2013; RANIERI et al., 2013, MAGALHAES et al., 2014; FIRMO, 2016; MELIN et al., 2016; VISAN et al., 2016).

Em ambas as espécies, o tumor surge espontaneamente ao longo de alguns anos, como resultado de múltiplas alterações genéticas e é frequentemente caracterizado por metástases microscópicas nos pulmões e em outros órgãos no momento do diagnóstico (SORENMO, 2003; KLOPFLEISCH et al., 2011; SHAFIEE et al., 2013; VISAN et al., 2016).

Não existe predisposição racial evidente, embora no Brasil ocorram mais frequentemente em cadelas sem raça definida (SRD), devido a predominância de cães mestiços no país (RUTTEMAN et al., 2001; CASSALI, 2006). O tamanho dos nódulos pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro até massas com mais de 15 cm no seu maior diâmetro. Geralmente, as neoplasias mamárias apresentam-se como nódulos circunscritos e de dimensões variáveis (RUTTEMAN et al., 2001).

O diagnóstico inicial de uma neoplasia mamária em cadelas é baseado na idade, histórico reprodutivo e sinais clínicos, incluindo a presença de edema mamário e aumento de linfonodos regionais (CASSALI et al., 2006). Para se atribuir o diagnóstico e estimar o prognóstico da cadela acometida por neoplasia mamária, é

necessário a remoção cirúrgica da mesma (CHANG et al., 2005; MATOS et al., 2012), seguindo-se da caracterização do tipo histopatológico, grau de malignidade, estadiamento clínico, determinação do tamanho do nódulo, existência de metástase em linfonodos regionais e presença de metástases distantes. Também devem ser avaliados fatores que interferem na proliferação e diferenciação celular desregulada e apoptose das células neoplásicas ou linfócitos T (PHILIBERT et al., 2003; CHANG et al., 2005; LAS MULAS et al., 2005; KUMARAGURUPARAN et al., 2006; MATOS et al., 2012).

O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia e a classificação é importante para indicar o comportamento biológico (PINHO et al., 2012). Assim, é considerado o método mais confiável no diagnóstico de neoplasias mamárias caninas, já que permite a avaliação de fatores como infiltração vascular, cutânea e de tecidos moles, fornecendo dados como grau de diferenciação, índice mitótico e presença de necrose (MISDORP et al., 1999). O diagnóstico microscópico considera o padrão tecidual classificado como ductal, papilar, tubular e sólido (PINHO et al., 2012).

2.2 Classificação das Neoplasias Mamárias

Os tumores mamários caninos tanto benignos quanto malignos, podem ser classificados em simples e complexos. Os tumores simples são aqueles compostos por células epiteliais e os complexos são aqueles formados por células epiteliais e mioepiteliais. Os tumores mamários podem ainda ser classificados como mistos, quando há a presença de metaplasia (MISDORP et al., 1999).

2.3 Neoplasias Mamárias Benignas

As lesões mamárias epiteliais não neoplásicas e as neoplasias mamárias benignas incluem: hiperplasia ductal, hiperplasia lobular, adenose, cisto, ectasia, fibrose focal, adenoma simples, adenoma complexo, adenoma basalóide, fibroadenoma de baixa celularidade, fibroadenoma de alta celularidade, tumor misto benigno e papiloma ductal (MISDORP et al., 1999).

A hiperplasia ductal refere-se às proliferações caracterizadas por projeções supranumerárias das células epiteliais que são morfológicamente semelhantes às células do ducto e apresentam pleomorfismo nuclear discreto. Histologicamente, a atipia celular é determinada por pequenas células com núcleo uniforme. Estas células formam pontes sólidas no lúmen do ducto e são delimitadas pela camada de células mioepiteliais adjacentes (FERREIRA et al., 2012; CASSALI, 2013).

A hiperplasia lobular ocorre nas unidades lobulares terminais da glândula mamária. Neste tipo de lesão, as células epiteliais possuem comportamento morfológico distinto. As células apresentam distribuição uniforme e ocupam as unidades acinares levando ao crescimento do mesmo. Não mais do que quatro unidades devem estar comprometidas na hiperplasia lobular típica. Quando cinco ou mais unidades são afetadas, a lesão é classificada como hiperplasia lobular atípica (FERREIRA et al., 2012; CASSALI et al., 2013).

Os cistos mamários podem ser papilares ou não papilares. Os cistos papilares, como a maioria das lesões proliferativas na cadela, são os tipos complexos frequentemente encontrados. A diferenciação entre lesão mamária intracística, intraductal, papiloma ou papilomatose torna-se difícil, geralmente. Os cistos não papilares apresentam dupla camada de epitélio que pode estar ausente muitas vezes. Na maioria dos casos existem múltiplos cistos em uma ou mais glândulas mamárias e a diferenciação de ectasia ductal pode ser difícil (MISDORP et al., 1973).

A ectasia de ductos mamários é um achado comum em cadelas e gatas e que muitas vezes leva a transformação total da glândula mamária em uma massa esponjosa. Inflamação com alterações epiteliais secundárias podem ocorrer. A ectasia afeta os ductos terminais, intralobulares e ácinos. A hiperplasia lobular, incluindo o tipo inflamatório também pode ocorrer juntamente com ectasia (MISDORP et al., 1999).

A adenose é uma lesão caracterizada por aumento no número de ácinos e dilatação do ducto intralobular, aumentando assim, o diâmetro das unidades lobulares. Alterações discretas do tecido epitelial, mioepitelial e fibrose periductal podem ocorrer. Em cães não é uma lesão comum e parece não estar relacionada à progressão neoplásica (FERREIRA et al., 2012; CASSALI, 2013).

As neoplasias mamárias benignas constituem cerca de 50% das neoplasias mamárias caninas, dentre os quais adenomas complexos, fibroadenomas e tumores mistos benignos constituem os grupos mais representativos. Adenomas simples, adenomas basalóides e papilomas ductais são neoplasias benignas incomuns na espécie canina (MISDORP et al., 1999).

Os adenomas são definidos como neoplasias benignas de células epiteliais ou mioepiteliais bem diferenciadas. O adenoma simples é composto por células epiteliais bem diferenciadas e classificado como tubular simples com epitélio secretor (CASSALI, 2002). No entanto, alguns casos foram relatados e apresentaram nódulos de crescimento sólido de células fusiformes com estroma escasso que foi denominado adenoma mioepitelial sólido. Este tipo é muito comum nas mulheres, mas em cadelas e gatas é extremamente raro (MISDORP et al., 1973).

O adenoma complexo é frequentemente reportado em cadelas e gatas, mas nas mulheres não. Esta neoplasia benigna é composta por proliferação de células epiteliais e mioepiteliais. Concomitantemente, pode haver o desenvolvimento de fibroadenoma, tumor misto benigno e hiperplasia lobular (MISDORP et al., 1973).

O adenoma basalóide consiste em cordões uniformes e arranjos de células epiteliais monomórficas e as células periféricas estão orientadas no sentido contrário ao da lâmina basal (CASSALI, 2002).

O fibroadenoma origina-se da proliferação de elementos do estroma e células epiteliais. Dois tipos são relatados: fibroadenoma pericanicular onde o epitélio está em volta do estroma e fibroadenoma intracanalicular, onde o epitélio está comprimido e deformado pelo estroma. A classificação de fibroadenoma de baixa celularidade e de alta celularidade também é descrita (CASSALI, 2002).

O tumor misto benigno é a neoplasia benigna mais comum em cadelas (CASSALI, 2013), sendo caracterizado pela proliferação benigna de células que são morfológicamente semelhante ao componente epitelial (luminal ou mioepitelial) e células mesenquimais que produzem cartilagem, osso ou tecido adiposo e em combinação com tecido fibroso (MISDORP et al., 1999). A proliferação de células mioepiteliais possui aspecto fusiforme ou estrelado com abundante MEC ao redor (AULER et al., 2011). Pleomorfismo e atipia celular podem estar presentes e dificultam

o diagnóstico principalmente nos casos de tumor misto maligno ou carcinoma em tumor misto maligno (CASSALI, 2013).

O papiloma ductal é definido como neoplasia benigna ramificada no ducto distendido com proliferação organizada do epitélio ductal no eixo fibrovascular bem definido. O epitélio é distribuído numa única camada, com atipia celular e atividade mitótica mínima (CASSALI, 2002).

2.4 Neoplasias Mamárias Malignas

As neoplasias mamárias malignas podem ser classificadas em carcinoma não infiltrativo (*in situ*), complexo, ou simples que incluem os subtipos tubular, papilífero, tubulopapilífero, sólido ou anaplásico. Os tipos especiais de carcinoma incluem o carcinoma escamoso mamário, mucinoso e o rico em lipídeos. As neoplasias mamárias de origem mesenquimal que ocorrem na glândula mamária são os fibrossarcomas, osteossarcomas, condrossarcomas e lipossarcomas. Além disso, são descritos os tumores mistos malignos, carcinosarcomas e sarcoma em tumor misto (MISDORP et al., 1999).

As neoplasias mamárias mais comuns das cadelas são os carcinomas (tumores de origem epitelial), mais especificamente os carcinomas simples, que dividem-se por ordem crescente de malignidade em tubulopapilíferos, sólidos e anaplásicos. Os carcinomas complexos distinguem-se dos simples por possuírem tanto componente epitelial quanto mioepitelial (MISDORP et al., 1999).

O carcinoma *in situ* é considerado precursor da transformação maligna de lesões na glândula mamária (MOUSER et al., 2010). Este tipo é caracterizado por proliferação maligna de células epiteliais na unidade ductal extralobular ou unidade terminal lobular. As células neoplásicas malignas ocupam o lúmen do ducto sem a descontinuidade da membrana basal. O carcinoma *in situ* com microinvasão é definido quando a membrana basal perde a continuidade e arranjos de células epiteliais menores que um mm estão presentes (HANBY e HUGHES, 2008).

O carcinoma complexo possui componente epitelial maligno e componente mioepitelial benigno. A neoplasia caracteriza-se pela presença de duas populações de células sustentadas pelo estroma fibrovascular. A primeira população de células

epiteliais está arranjada em túbulos irregulares revestidos por uma ou várias camadas de células cubóides a colunares com escassa ou moderada quantidade de citoplasma eosinofílico. Estas células apresentam moderada ou intensa anisocariose e anisocitose, além de numerosas figuras de mitoses. Necrose das células epiteliais pode ser focal ou multifocal e focos ocasionais de diferenciação escamosa podem estar presentes. A segunda população é composta por células fusiformes (células mioepiteliais) dentro do interstício, dispostos em feixes irregulares dentro de uma matriz (mixóide) fibrilar basofílica. Estas células têm limites mal demarcados, citoplasma homogêneo eosinofílico escasso a moderado, núcleo ovóide central com cromatina finamente pontilhada e pequeno nucléolo central. Anisocariose e anisocitose são mínimas. Na periferia da neoplasia, pode haver focos inflamatórios que consiste principalmente de linfócitos e células plasmáticas. O carcinoma complexo deve ser diferenciado do adenoma complexo por sua maior celularidade, além do pleomorfismo significativamente presente no componente epitelial, aumento do índice mitótico, focos de necrose e padrão de crescimento infiltrativo (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

O carcinoma tubulopapilífero é caracterizado pela formação de projeções tubulares e papilares. Em cães, este tipo de carcinoma pode ser acompanhado por marcada proliferação de fibroblastos (MISDORP et al., 1999). O carcinoma tubulopapilífero é classificado por túbulos neoplásicos que estão predominantemente arranjados em papilas sésseis ou pedunculadas. O carcinoma tubulopapilífero mamário difere do tipo tubular por apresentar papilas que se estendem no lúmen tubular e pela quantidade de arranjos ou projeções formadas. As papilas são sustentadas pelo estroma fibrovascular do tecido conjuntivo (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

O carcinoma sólido também é considerado comum na espécie canina e são observados quando se desenvolvem por longo período de tempo sem intervenção cirúrgica (CASSALI, 2013). Microscopicamente ocorre proliferação de células epiteliais organizadas em arranjo sólido com formação de cordões, ninhos ou aglomerados de células. As células neoplásicas são indiferenciadas, exibem núcleos pequenos e hipercromáticos, índice mitótico alto e algumas células possuem vacúolos

no citoplasma. A quantidade de estroma é variável e áreas de necrose são comuns (CASSALI, 2002).

O carcinoma anaplásico reportado em cães possui prognóstico desfavorável, pois as cadelas apresentam recidiva precoce e metástase, confirmando o comportamento agressivo. Este tipo histopatológico é caracterizado por infiltração difusa, proliferação epitelial atípica, sem arranjos delimitados e células individuais que invadem o estroma. Estas células são grandes, algumas multinucleadas, anaplásicas, com núcleos bizarros, nucléolo proeminente e índice mitótico alto. Além disso, podem ser observadas células neoplásicas nos vasos sanguíneos e linfáticos. A presença de processo inflamatório é uma característica deste tipo de neoplasia (MISDORP et al., 1999).

Os tumores mistos são frequentes na glândula mamária de cadelas e exibem padrão histopatológico complexo, pois possuem origem do componente epitelial e mioepitelial. Alguns sofrem transformação maligna levando ao desenvolvimento de tumor misto maligno. Os tumores mistos contêm focos de células epiteliais com elevado pleomorfismo e mitoses atípicas. As células epiteliais malignas geralmente possuem crescimento infiltrativo que pode ser identificado pela perda de continuidade da membrana basal e formação de aglomerados de células neoplásicas que penetram o estroma (RIBEIRO et al., 2012).

Na espécie canina, o carcinoma de células fusiformes é relativamente raro e apresenta crescimento expansivo ou infiltrativo que pode ser acompanhado de invasão de vasos linfáticos. Esse tipo de carcinoma apresenta características histopatológicas semelhantes ao fibrossarcoma e por isso a diferenciação entre eles pode ser difícil, mas a presença de fibras de reticulina pode ajudar na elucidação do diagnóstico (MISDORP et al., 1973).

O carcinoma de células escamosas é composto por arranjos sólidos que formam cordões e áreas de diferenciação escamosa. Células basalóides estão presentes na periferia do tumor e o centro da neoplasia é diferenciado formando camadas de queratina conhecidas como pérolas córneas. Além disso, a maioria deste tipo de carcinoma é infiltrativo e a invasão linfática é comum (CASSALI, 2002).

O carcinoma mucinoso não é bem descrito em literatura veterinária e é caracterizado pela presença abundante de material extracelular mucinoso (MISDORP

et al., 2002). É conhecido como carcinoma gelatinoso, colóide, mucoso ou mucóide. A proliferação de células epiteliais compõem arranjos no padrão sólido, tubular ou papilar com o espaço intersticial preenchido em abundância com secreção eosinofílica mucinosa reativas a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e azul de Alcian (MISDORP et al., 1999).

O carcinoma rico em lipídeos é considerado uma variante rara do carcinoma invasivo ductal na espécie humana e é extremamente raro na espécie canina. Possui crescimento expansivo, as células neoplásicas estão arranjadas em cordões separados por quantidade moderada de estroma e vacúolos no citoplasma. O diagnóstico é confirmado quando 80% das células neoplásicas são células que produzem lipídeos (PEREZ-MARTINEZ et al., 2005). Quando o material é congelado, o diagnóstico pode ser confirmado pela coloração especial de Sudam III ou IV, sendo positivo para as células produtoras de lipídeos (CASSALI et al., 2011).

O fibrossarcoma é definido como neoplasia maligna composta por fibroblastos pleomórficos, com quantidade variável de colágeno, arranjados em fibras reticulares paralelas ou não (MISDORP et al., 1999).

O osteossarcoma é definido como tumor mesenquimal maligno de células ósseas primitivas que se caracteriza pela formação osteóide de células neoplásicas (WITTIG et al., 2002; MISDORP et al., 1999). Devido à natureza multipotencial das células mesenquimais primitivas, a matriz envolvida nestes tumores pode conter variadas quantidades de tecido cartilaginoso, colágeno e osteóide (WITTIG et al., 2002). Este tipo de neoplasia pode ser composto por tecido ósseo e cartilaginoso ou ambos. Quando observa-se apenas formação de tecido cartilaginoso, a neoplasia é classificada como condrossarcoma. Ambas apresentam pleomorfismo e índice mitótico alto estão presentes (MISDORP et al., 1999).

Os carcinosarcomas são neoplasias raras na espécie humana e possuem prognóstico pobre quando comparados a outros tipos de carcinomas (MELE et al., 2015). As características histológicas são extremamente variáveis. O crescimento é rápido e possuem diversos tipos de diferenciação. Possuem duas linhas celulares malignas distintas envolvendo o componente epitelial (carcinomatoso) e mesenquimal (sarcomatoso) (MISDORP et al., 1973; MELE et al., 2015).

O sarcoma em tumor misto é uma neoplasia de origem mesenquimal com focos ou nódulos de células neoplásicas em tumor misto maligno. O critério para avaliação da malignidade do componente mesenquimal de tumores mistos são os mesmos para os sarcomas, padrão de alto crescimento celular, presença de necrose, atipia celular e índice mitótico (EVANS et al., 1977).

2.5 Grau Histopatológico

A graduação histopatológica das neoplasias mamárias tem como objetivo avaliar a arquitetura do tecido e variações morfológicas, além de correlacionar com o comportamento biológico (ELSTON e ELLIS, 1991; CASSALI et al., 2014). Na medicina humana e na veterinária, o sistema de graduação mais utilizado é o sistema de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998) (Quadro 1). Este método permite avaliar os fatores de forma mais sistemática e com mais critérios objetivos (CASSALI et al., 2014).

Na medicina veterinária, o número de pesquisadores que adotaram o sistema de classificação para graduação histopatológica proposta por Nottingham, para avaliar os carcinomas mamários na espécie canina vem crescendo e representam ferramenta sensível que pode ser incorporada na medicina veterinária assim como foi na medicina humana (CASSALI et al., 2014).

De acordo com essa classificação, a determinação do grau histopatológico é baseada no índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. O grau histopatológico do tumor é obtido a partir da soma dos escores no qual o resultado pode variar de 3 a 9 pontos. O grau I é composto de 3 a 5 pontos, grau II de 6 a 7 pontos e grau III de 8 a 9 pontos. De maneira adicional, a anaplasia eleva a graduação histopatológica em um grau (ELSTON e ELLIS, 1998). A graduação histopatológica é considerada um indicador de prognóstico independente para neoplasias mamárias primárias nas mulheres (ELSTON e ELLIS, 1998; CASSALI et al., 2014).

Quadro 1: Resumo da graduação histopatológica nas neoplasias mamárias, proposto por Elston e Ellis (1998).

ÍNDICES	ESCORE
Formação Tubular	
75% da neoplasia	1
Entre 10 - 75% da neoplasia	2
< 10% da neoplasia	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante ao normal (2-3 x o tamanho da hemácia)	1
Aumento moderado no tamanho e variação do núcleo	2
Variação acentuada	3
Índice mitótico (CGA)*	
0 - 8 mitoses / 10 CGA	1
9 - 16 mitoses / 10 CGA	2
> 17 mitoses / 10 CGA	3

*CGA: campo de grande aumento.

2.6 Interações Entre o Tumor e Estroma

Nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, as células neoplásicas estão incorporadas no microambiente por meio do epitélio, mas estão separados do tecido conjuntivo adjacente pelo limite da membrana basal (HANAHAN e WEINBERG, 2000). A membrana basal, as células do sistema imunológico, capilares, fibroblastos e a MEC adjacente constituem o estroma tumoral (RONNOV-JESSEN et al., 1996). O carcinoma *in situ* está associado a um estroma semelhante ao observado durante o processo de cicatrização e é comumente chamado de “estroma reativo”. A influência do estroma reativo nas células neoplásicas e vice versa ainda é um tema bastante debatido (RONNOV-JESSEN et al., 1996). Ainda não está totalmente esclarecida a maneira pela qual o carcinoma *in situ* permanece localizado contido pela membrana basal ou torna-se invasivo por meio da degradação da membrana basal (Figuras 1 e 2) (HANAHAN e WEINBERG, 2000; KALLIURI, 2003).

Existe interesse constante em entender as diferenças entre o estroma normal e o reativo. O estroma normal na maioria dos órgãos contém um número mínimo de fibroblastos associados a MEC fisiológica (RONNOV-JESSEN et al., 1996). O estroma reativo está associado ao aumento do número de fibroblastos, maior densidade capilar, colágeno do tipo II e deposição de fibrina. Isso demonstra que o estroma reativo promove sinalização para facilitar a oncogênese (DOLBERG et al., 1985).

Além de influenciar a migração de células neoplásicas, a MEC também atua em diversas vias por meio da modulação da liberação de fatores de crescimento e de interações diretas entre células e integrinas (HYNES, 1992). Estes estudos indicam que os fibroblastos podem afetar a progressão neoplásica pela secreção e organização da MEC alterada dentro do estroma tumoral. Entretanto, os efeitos da MEC alterada nos tumores e os fibroblastos associados ao tumor na angiogênese durante a progressão neoplásica ainda é pobremente compreendido (KALIURI e ZEISBERG, 2006).

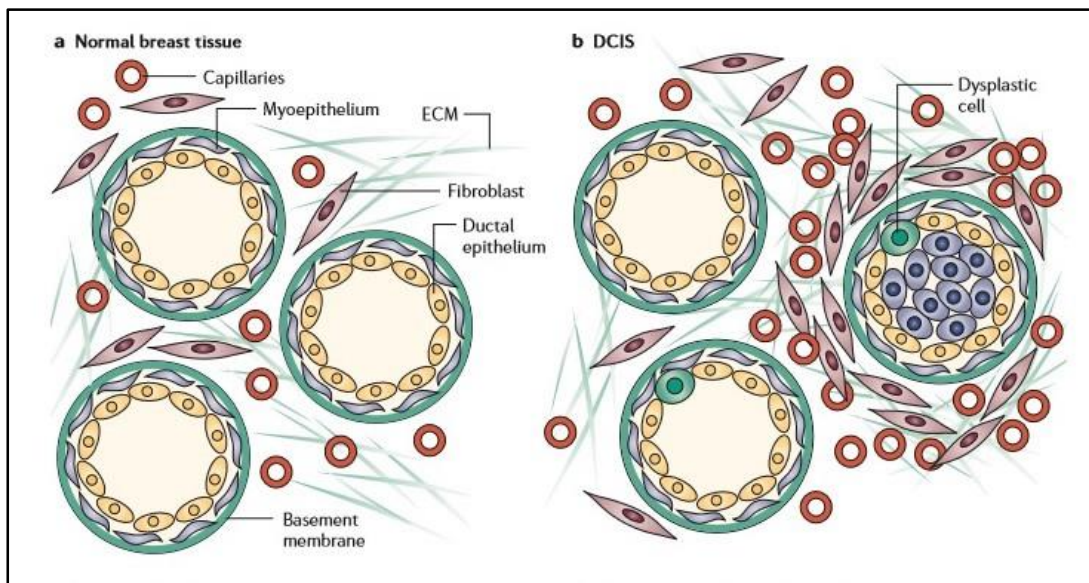


FIGURA 1: Ilustração das interações entre o tumor e o estroma durante os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário ductal. **A:** Tecido mamário normal. O epitélio ductal e a camada de células mioepiteliais estão separadas pela membrana basal do tecido conectivo circundante, MEC, capilares e fibroblastos. **B:** Carcinoma ductal *in situ*. O lúmen contém células displásicas, parede do ducto torna-se irregular, camada de células mioepiteliais indistintas, podem ser observadas áreas da membrana basal intactas e alteradas. O tecido conectivo ao redor é caracterizado por deposição de MEC fibrilar, acúmulo de fibroblastos e aumento da densidade de capilares sanguíneos (KALIURI e ZEISBERG, 2006).

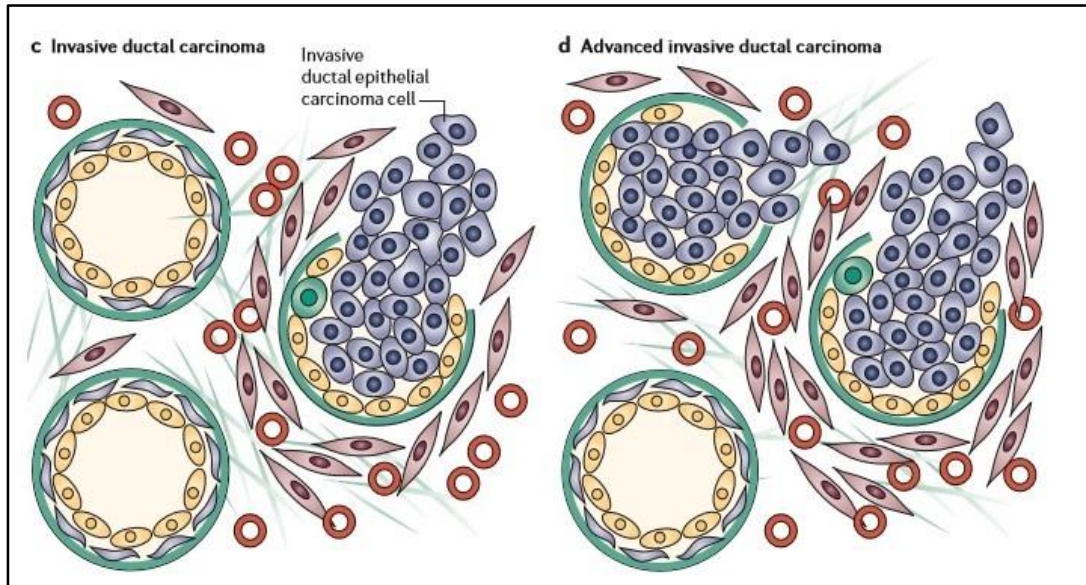


FIGURA 2: Ilustração das interações entre o tumor e o estroma durante os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário ductal. **C:** Carcinoma ductal invasivo. A membrana basal está rompida e as células tumorais formam áreas semelhantes ao ducto normal sem a definição da membrana basal. O estroma que circunda as células tumorais contém miofibroblastos, infiltrado inflamatório e formação de novos capilares sanguíneos. **D:** Carcinoma ductal avançado. As células tumorais formam arranjos em forma de cordões e há invasão do estroma fibroso (KALIURI e ZEISBERG, 2006).

2.7 Fibrose Tecidual

A rigidez dos tecidos associada ao tumor é uma característica do microambiente tumoral. Estudos recentes já indicaram que a rigidez do tumor pode influenciar na progressão neoplásica envolvendo a MEC. A rigidez tecidual é clinicamente conhecida como fator de risco oncogênico quando correlacionada ao tecido mamário denso e cirrose hepática, por exemplo. Além disso, a rigidez do tumor é uma das características clínicas examinadas durante a palpação de nódulos mamários (LIU et al., 2016). O tecido mamário neoplásico é mais rígido do que o tecido normal e pensa-se que o processo de enrijecimento começa na fase precoce do desenvolvimento do mesmo (BARR et al., 2015).

De modo geral, a fibrose é um processo ativo biossintético marcado por acúmulo desregulado de MEC em lesões crônicas por isquemia, agentes químicos e toxinas, infecções virais e não virais, danos físicos e reação imunológica (THANNICKAL, 2004; WYNN, 2008; GUARINO et al., 2009). A fibrose do parênquima de órgãos epiteliais e falência de órgãos em doenças terminais representam a fase

final e via comum de muitas doenças crônicas, tornando-se um dos principais determinantes para morbidade e mortalidade dos animais (GUARINO et al., 2009).

Em muitos aspectos, o processo fibrótico é comparável ao de reparação normal e consiste em uma resposta ao tecido induzida por lesão com inflamação, liberação local de citocinas, ativação e proliferação de fibroblastos/miofibroblastos e deposição do esqueleto da matriz (WYNN, 2008).

A fibrose é uma resposta complexa e iniciada para proteger o organismo de um evento prejudicial, no entanto, leva a lesões graves em órgãos quando se torna independente do evento estimulante inicial. Trata-se da deposição maciça de matriz pelas células fibrogênicas que interrompem a arquitetura normal do tecido e promovem a destruição do parênquima (GUARINO et al., 2009).

O processo de fibrose nos órgãos parenquimatosos e epiteliais pode ser resumido em três etapas: (1) células epiteliais danificadas liberam citocinas ativadoras, principalmente de TGF β (fator de crescimento transformante- β) que atraem células inflamatórias para o local da injúria primária; (2) infiltração de células inflamatórias que secretam citocinas adicionais e, posteriormente, causam danos ao parênquima epitelial, estimulando os fibroblastos/miofibroblastos a proliferar e produzir mais proteínas da matriz; e (3) fibrogênese que depende de um mecanismo de auto estimulação contínua mesmo depois que o principal estímulo nocivo e a inflamação tenha cessado (GUARINO et al., 2009).

Os fibroblastos foram descritos pela primeira vez no final do século XVI, com base em sua localização e aparência microscópica (KALLIURI e ZEISBERG, 2006). São células não vasculares, não epiteliais e não inflamatórias e são o principal componente celular do tecido conjuntivo (Figura 3). Estão incorporados dentro da matriz celular do tecido conectivo que, em grande parte, é responsável pela sua síntese. As funções importantes dos fibroblastos incluem a deposição de MEC, regulação da diferenciação epitelial e da inflamação, além da participação na cicatrização e reparação de feridas. Os fibroblastos sintetizam muitos dos componentes da MEC, tais como colágeno tipo I, tipo III, tipo V e fibronectina, além de contribuir para a formação de membranas basais pela secreção de colágeno do tipo IV e laminina. Ademais, são importante fonte de proteases que degradam a MEC, tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), o que evidencia seu papel

fundamental na manutenção da homeostase da MEC. Além disso, os fibroblastos são importantes na manutenção da homeostase do epitélio adjacente pela secreção de fatores de crescimento e interações mesenquimais-epiteliais diretamente nas células (Figura 3) (BRYONY et al., 2002; KALLIURI e ZEISBERG, 2006).

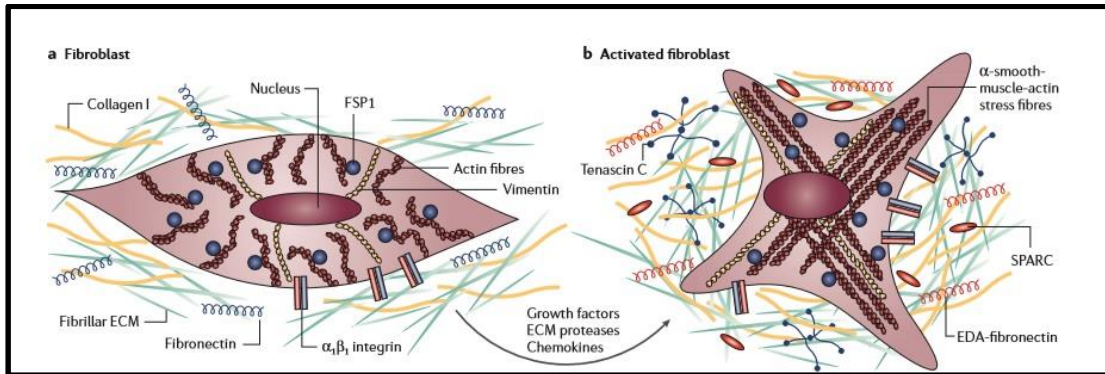


Figura 3: A: Fibroblasto normal circundado pela MEC do tecido conjuntivo que consiste em grande quantidade de colágeno tipo I e fibronectina. Os fibroblasto interagem com o microambiente adjacente através das integrinas ($\alpha_1\beta_1$). Tipicamente, são células fusiformes com proeminente citoesqueleto de actina e filamentos intermediários de vimentina. Embora a detecção de fibroblastos seja desafiadora, os biomarcadores mais utilizados não são específicos para fibroblastos, a proteína 1 fibroblasto específica (FSP1) é específica para fibroblastos nos tecidos normais. **B:** Fibroblasto que adquiriu fenótipo ativado e que está associado com o aumento da atividade proliferativa e da secreção de proteínas da MEC como colágeno tipo I, tenascina C, fibronectina que contém o domínio EDA e SPARC (proteína ácida secretora e rica em cisteína). Fibroblastos ativados são caracterizados por expressarem actina de músculo liso- α . Diversos fatores de crescimento, como TGF β e quimiocinas como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1) e proteases de degradação de MEC mediam a ativação de fibroblastos. (KALLIURI e ZEISBERG, 2006)

Quando as lesões são invadidas por fibroblastos, a geração de MEC ocorre para sustentar outras células e fazer com que os elementos do citoesqueleto facilitem a contração e cicatrização de feridas. Como principal fonte de componentes da MEC, os fibroblastos são considerados os principais mediadores da formação de cicatriz e fibrose. Estas células que são isoladas a partir do local de uma ferida ou do tecido fibrótico secretam níveis elevados de componentes da MEC. Uma vez que a ferida é reparada, o número de fibroblastos ativados diminui significativamente. Ainda não se sabe se os fibroblastos ativados são revertidos para um fenótipo de repouso ou se sofrem apoptose seguido pelo repovoamento da região específica do tecido por fibroblastos em repouso a partir do tecido adjacente (KALLIURI e ZEISBERG, 2006).

Nos últimos anos, a compreensão do mecanismo de fibrose tem se aprofundado e a fibrose crônica tem sido associada às neoplasias mamárias, configurando mau prognóstico aos pacientes. Estudos demonstraram claramente que à medida que a fibrose progride, aumenta gradualmente a sinalização das células pré-neoplásicas em conjunto com citocinas pró-inflamatórias como IL-6, interleucina-8 (IL-8), interleucina-2 (IL-2), TNF- α e interferons (IFN). Assim, atualizações constantes da fibrose patológica são importantes para compreender os mecanismos subjacentes das neoplasias mamárias (KALLIURI e ZEISBERG, 2006).

Neste contexto, estudos investigando os mecanismos envolvidos no processo de fibrose vêm adquirindo interesse crescente. A fibrose possui participação em diversas situações patológicas e ainda tem sido descrita função adicional associada ao desenvolvimento das neoplasias mamárias caninas. Porém, a fibrose continua a ser um desafio e um dos principais objetivos consiste em encontrar caminhos que proporcionem elucidação da regulação e atividade deste processo para melhor compreender o papel da fibrose na evolução de inúmeras neoplasias, incluindo as neoplasias mamárias em cadelas.

3. HIPÓTESE

As neoplasias mamárias malignas consideradas agressivas, com alto grau histopatológico e com curto período de evolução apresentaram maior intensidade de fibrose associada ao tecido neoplásico quando comparadas com as neoplasias mamárias benignas em cadelas. Além disso, as neoplasias mamárias malinas exibiram maior intensidade de fibrose quando submetidas a análise quantitativa deste processo patológico.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Objetivou-se com este estudo correlacionar a presença de fibrose em amostras de diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias malignas e benignas de cadelas.

4.2 Específicos

1 - Mensurar a porcentagem de fibrose dos tecidos neoplásicos, avaliada por meio de programa de imagens Image-Pro Plus16 versão 4.5.

2 – Classificar os diferentes tipos histopatológicos das neoplasias mamárias caninas correlacionando de acordo com a porcentagem de fibrose encontrada.

3 – Correlacionar a porcentagem de fibrose com o grau histopatológico, tempo de evolução e malignidade das neoplasias mamárias.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP/Jaboticabal, processo nº 023705/12.

Foi realizado um estudo retrospectivo com amostras de tumores mamários de animais oriundos da rotina do Serviço de Obstetrícia Veterinária da FCAV, UNESP/Jaboticabal, Brasil, janeiro de 2013 a fevereiro de 2014.

Os prontuários de todos os animais incluídos neste estudo foram revisados e dos dados referentes a idade, tamanho e localização dos nódulos, diagnóstico histopatológico foram coletados para posterior análise descritiva e estatística dos resultados obtidos.

5.1 Grupos experimentais

Foram selecionadas neste experimento 85 amostras de tumores mamários de cadelas, de diferentes idades e raças. Selecionou-se apenas uma amostra por animal, sendo que para os animais que apresentaram dois ou mais tipos histopatológicos diferentes foram selecionados apenas uma amostra com o tipo histopatológico considerado mais agressivo. Após a realização da classificação histopatológica das neoplasias mamárias, os tumores foram estabelecidos em dois grupos experimentais de acordo com as características observadas.

Grupo 1 (G1): neoplasias mamárias com características benignas (n = 21);

Grupo 2 (G2): neoplasias mamárias com características malignas (n = 64).

5.2 Diagnóstico Histopatológico das Neoplasias Mamárias

O diâmetro dos nódulos mamários foi mensurado por meio de paquímetro e, em seguida, realizada a classificação do tamanho de nódulos mamários em cães (T), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN, 1980). Os nódulos foram classificados em T1 (diâmetro até 3 cm), T2 (diâmetro entre 3 a 5 cm) e T3 (diâmetro maior que 5 cm).

Os fragmentos das neoplasias mamárias foram colhidos e encaminhados para processamento ao Departamento de Patologia Veterinária da UNESP/Jaboticabal, para diagnóstico histopatológico e análise em microscopia de luz. Os fragmentos colhidos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfato (pH 7,4) por 24 horas. Após a fixação foram desidratados em soluções de concentração decrescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a técnica histológica de rotina. Os cortes foram feitos em 5 μ m (micrótomo) e

posteriormente corados por hematoxilina e eosina (HE) para posterior identificação das principais alterações morfológicas.

Em análise microscópica de luz, foi efetuada a classificação da neoplasia, segundo os critérios de Misdorp et al. (1999) (Apêndice A). A graduação histopatológica foi realizada segundo a metodologia descrita por Elston e Ellis (1998).

5.3 Avaliação da Fibrose Tecidual

Em relação à avaliação da fibrose tecidual, o presente estudo analisou a quantidade e grau de intensidade da fibrose nas cadelas acometidas por neoplasias mamárias benignas e malignas. Assim, foi escolhida uma abordagem prática utilizando a técnica de coloração histológica e a análise da mesma foi baseada em dois grupos experimentais.

Utilizando os mesmos fragmentos de nódulos mamários incluídos em parafina, realizou-se novos cortes de 5 μ m os quais foram corados com a coloração Tricômico de Masson (TM) para visualização de tecido conjuntivo e determinação da fibrose. Neste caso, determinou-se escore para as áreas de fibrose tecidual observadas nas amostras de neoplasias mamárias caninas. A quantificação da fibrose foi realizada por meio da Classificação de Banff (SOLEZ et al., 1993), da seguinte maneira: grau 1: fibrose discreta (6 - 25% da amostra); grau 2: fibrose moderada (25,01 - 50% da amostra); e grau 3: fibrose severa (\geq 50,01% da amostra).

Para a avaliação da área de fibrose tecidual, todas as lâminas foram fotografadas em cinco campos aleatórios (objetiva de 20 x). Posteriormente, as imagens foram submetidas ao programa de processamento, medida e análise de imagem (Image-Pro Plus16 versão 4.5) para cálculo automático da porcentagem da área marcada. O resultado de cada lâmina foi obtido a partir do cálculo da média das porcentagens de áreas marcadas nas cinco imagens.

5.4 Análise Estatística

A porcentagem de fibrose foi comparada entre as neoplasias benignas e malignas em relação ao diagnóstico histopatológico, idade, tempo de evolução

tumoral e grau histopatológico dos tumores por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A relação entre o grau histopatológico, malignidade, idade e tempo de evolução foi realizada pelo teste de correlação de Pearson.

Após o cálculo da mediana da porcentagem de fibrose nas neoplasias malignas, foram testadas a sensibilidade, a especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia do teste para diagnóstico de malignidade. A relação entre a porcentagem de fibrose e probabilidade do diagnóstico ser maligno também foi testada por meio de regressão logística binária.

A significância para todos os testes foi definida em 95% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar a idade das cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, verificou-se que a idade média foi de 10,04 anos, prevalecendo as de 10 anos, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência absoluta e relativa (%) da idade de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

	IDADE	
	Frequência absoluta	%
7 anos	19	22,35%
8 anos	06	7,06%
9 anos	09	10,58%
10 anos	21	24,70%
11 anos	5	5,88%
12 anos	07	8,23%
13 anos	10	11,76%
14 anos	07	8,23%
15 anos	01	1,21%
Total	85	100%

De acordo com os resultados desse estudo retrospectivo, verificou-se que a média da idade das fêmeas acometidas (dez anos, com variação entre sete e quinze

anos) foi semelhante ao descrito por Sanches et al. (2000), Rutteman et al. (2001), De Nardi (2002) e Firmo (2016), os quais descreveram que as neoplasias mamárias caninas acometeram fêmeas entre sete e doze anos.

Em relação às raças mais frequentes encontradas neste estudo, constatou-se maior incidência em fêmeas sem raça definida (SRD), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Frequência absoluta e relativa (%) das raças de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

RAÇAS		
	Frequência absoluta	%
SRD	39	45,91
Poodle	20	23,52
Pinscher Miniatura	06	7,06
Akita Inu	04	4,70
American Pit Bull Terrier	03	3,53
Labrador Retriever	03	3,53
Boxer	02	2,35
Cocker Spaniel	02	2,35
Rottweiler	02	2,35
Shih-Tzu	02	2,35
Pointer	02	2,35
Total	85	100

As raças mais frequentemente encontradas descritas acima corroboraram aos dados descritos por Cassali et al. (2006) e Ribeiro et al. (2009), que relataram assiduidade das raças Poodle, Dachshund, Pointers e Retrievers no desenvolvimento de neoplasias mamárias, além de fêmeas SRD. Sanches et al. (2000), Rutteman et al. (2001) e De Nardi et al. (2002), explicaram que a maior incidência de fêmeas SRD são predominantes na região estudada e que apenas refletem a população do local onde foi realizado o estudo.

Em relação à localização dos nódulos mamários estudados, constatou-se maior frequência em mama inguinal esquerda (M5E) e abdominal caudal direita (M4D), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3: Frequência absoluta e relativa (%) da localização dos nódulos nas cadeias mamárias direita e esquerda de cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

Localização	Frequência	%
M1D	0	0
M2D	4	4,70
M3D	13	15,29
M4D	20	23,53
M5D	13	15,29
M1E	1	1,19
M2E	2	2,35
M3E	3	3,53
M4E	09	10,59
M5E	20	23,53
Total	85	100

Quando se observou a localização dos nódulos mamários do presente estudo, verificou-se semelhança ao relatado por Oliveira Filho et al. (2010), Shaffie et al. (2013), Cintra et al. (2014) e Feliciano et al. (2012) que afirmaram que as mamas inguinais foram as que apresentaram maior incidência de nódulos mamários. O maior número de nódulos nas mamas inguinais pode ser atribuído a maior quantidade de parênquima nessas mamas (QUEIROGA e LOPES, 2002). Contudo, a explicação mais provável seja de que existam receptores hormonais em maior número nessas mamas, favorecendo assim a ocorrência de neoplasias nesta localização (DONNAY et al., 1995).

Em relação ao tamanho dos nódulos mamários analisados no presente estudo, constatou-se maior frequência de nódulos que variaram de 3 a 5 cm de diâmetro (T2),

seguido de nódulos menores de 3 cm (T1) e nódulos maiores de 5 cm de diâmetro (T3), como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4: Frequência absoluta e relativa (%) do tamanho dos nódulos em cadelas acometidas por neoplasias mamárias nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

	Frequência absoluta	%
T1*	36	42,36
T2*	39	45,88
T3*	10	11,76
Total	85	100

T1*: < 03 cm. T2*: 3,01 – 05 cm. T3*: > 05 cm

Informações quanto ao tamanho dos nódulos mamários foram fornecidas por Oliveira Filho et al. (2010) que observaram o tamanho de 1.380 nódulos. Destes, 49,4% (n=682) eram nódulos T1, 19,1% (n=263) eram T2 e 31,4% (n=434) eram T3. Em estudo semelhante no Brasil, verificou-se que tumores T3 eram os mais prevalentes (OLIVEIRA et al., 2003, FERREIRA et al., 2012). No entanto, tumores T1 representaram 77,6% (ITOH et al., 2005) e 80,6% dos casos (HASHIMOTO et al., 2002) em estudos realizados no Japão. No presente estudo, a frequência foi maior em nódulos T2 (45,88%), porém, os nódulos T1 apresentaram porcentagem semelhante (42,36%), discordando dos resultados descritos por Hashimoto et al. (2002), Oliveira et al., 2003, Itoh et al. (2005) e Ferreira et al. (2012).

Nos últimos anos, os tutores de cães e gatos vem demonstrando maior cuidado em relação aos animais de estimação. Desta maneira, cada vez mais, os tutores procuram atendimento médico veterinário já no início dos sintomas de diversas patologias, incluindo o desenvolvimento ou presença de tumores mamários. Atualmente, já existem diversas especialidades médicas de pequenos animais e a oncologia veterinária é também responsável pelo atendimento de neoplasias mamárias. Além disso, nos dias atuais, as campanhas de prevenção e conscientização vêm ganhando espaço, aumentando assim o cuidados dos tutores de

pequenos animais. Portanto, todos estes fatores somados ou associados podem explicar a maior frequência de nódulos T1 e T2 em nosso estudo, revelando possivelmente maior preocupação com a remoção precoce de nódulos mamários.

Não foi observada correlação entre o tamanho dos nódulos como fator preditivo de malignidade, assim como no estudo realizado por Agra (2011) que relatou resultados semelhantes. Entretanto, já foram relatados em outros estudos que existe forte associação entre tamanho tumoral e malignidade (SORENMO et al., 2009) e que enfatizam a importância do tamanho do tumor como indicador prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas, mas há outros parâmetros mais confiáveis para essa predição, como os marcadores moleculares (FERREIRA et al., 2012).

Após análise histopatológica, diagnosticaram-se 21 massas apresentando características benignas e 64 apresentando características malignas. Entre as neoplasias benignas encontraram-se adenoma cístico, adenoma complexo, adenoma tubular, tumor misto benigno, além de lesões mamárias não neoplásicas como hiperplasia ductal e hiperplasia lobular.

Entre as neoplasias mamárias malignas observaram-se, tumor misto maligno (Figuras 4 A e B), carcinoma complexo (Figuras 4 C e D), carcinoma de células escamosas, carcinoma *in situ*, carcinoma tubulopapilífero e carcinoma sólido. A distribuição da frequência absoluta e a porcentagem de neoplasias mamárias em cadelas, de acordo com os grupos experimentais está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência absoluta e relativa (%) de neoplasias mamárias em cadelas, de acordo com o diagnóstico histopatológico, segundo a classificação de Misdorp et al. (1999) nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

Classificação	Frequência absoluta	%
Grupo I – tecidos benignos	21	24,74
Adenoma cístico	1	1,17
Adenoma tubular	2	2,35
Adenoma complexo	4	4,70
Tumor misto benigno	4	4,70
Hiperplasia ductal	4	4,70
Hiperplasia lobular	6	7,12
Grupo II- tecidos malignos	64	75,26
Carcinoma tubulopapilífero	18	21,17
Carcinoma sólido	13	15,29
Carcinoma complexo	07	8,23
Carcinoma células escamosa	02	2,35
Carcinoma in situ tubular	03	3,52
Tumor misto maligno	21	24,70
Total	85	100

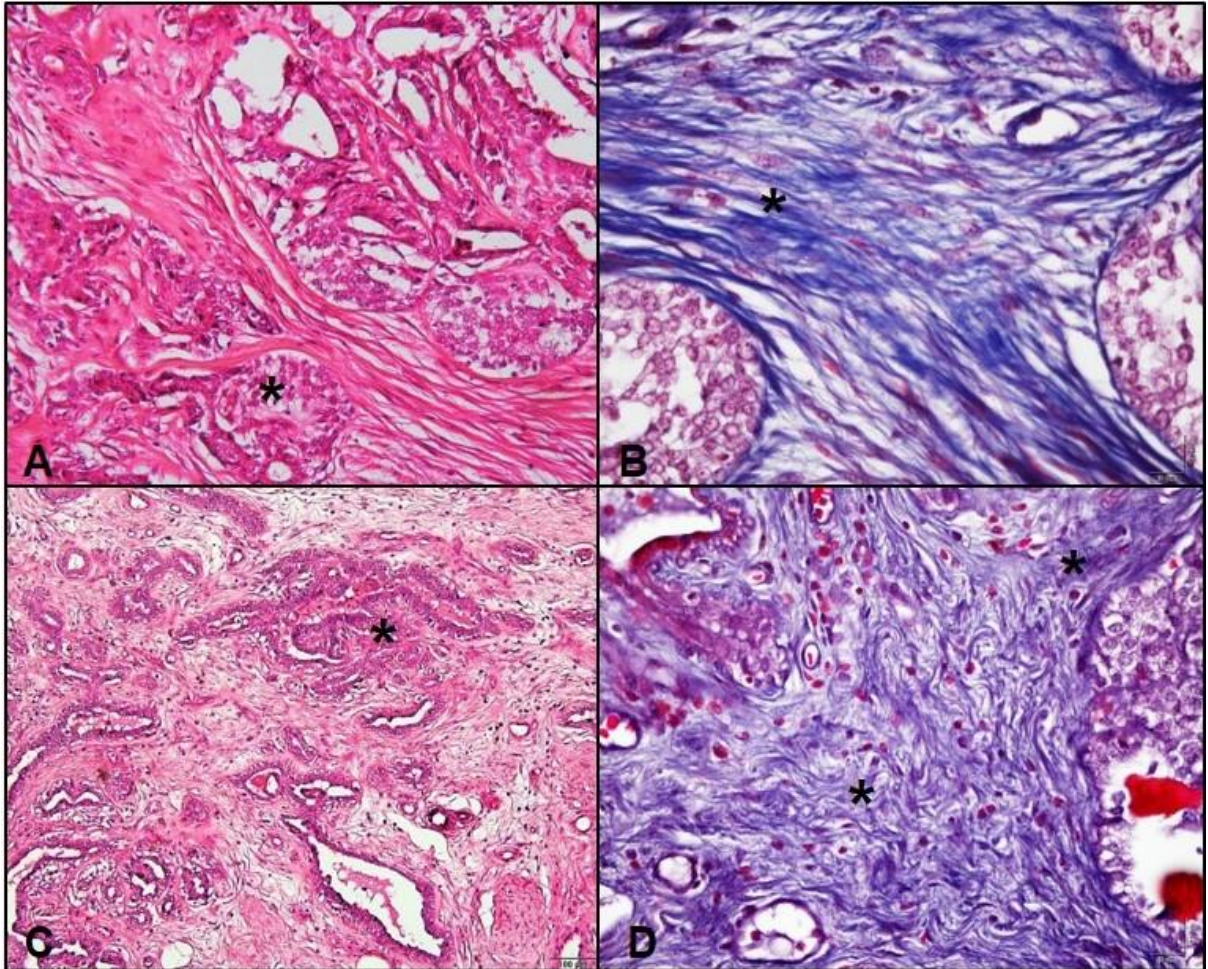


Figura 4: Fotomicrografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela. **A:** Carcinoma em tumor misto (*), HE, barra 100 μ m. **B:** Área de fibrose em carcinoma em tumor misto (*), TM, barra 100 μ m. **C:** Carcinoma complexo (*), HE, barra 100 μ m. **D:** Área de fibrose em carcinoma complexo (*), TM, barra 100 μ m.

Em relação ao grau histopatológico das neoplasias mamárias malignas utilizadas neste estudo, foi observado prevalência do grau I. As amostras foram classificadas em grau I, grau II e grau III, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Frequência absoluta e relativa (%) do grau histopatológico das neoplasias mamárias em cadelas de acordo com classificação de Elston e Ellis (1998) nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

Classificação	Frequência absoluta	%
Grau I	29	45,32
Grau II	25	39,06
Grau III	10	15,62
Total	64	100

Na análise histopatológica deste estudo, as neoplasias benignas caninas corresponderam a 24,74% e as malignas foram de 75,26% do total, corroborando aos autores Oliveira et al. (2003), Oliveira Filho et al. (2010), Sorenmo et al. (2009), Feliciano et al. (2012) e Soler et al. (2016) que relataram porcentagens semelhantes 73,4%, 79,9%, 60% e 65,38% de casos malignos, respectivamente.

A frequência de casualidade de neoplasias benignas e malignas varia acentuadamente nos dados consultados na literatura devido, provavelmente, à existência de diferentes métodos de classificação dos tumores mamários e ausência de critérios regulares para diferenciar os tipos tumorais (CASSALI et al., 2003). Na literatura internacional consultada, as porcentagens para neoplasias malignas foram inferiores a 54% (RUTTEMAN et al., 2001, MISDORP 2002, ITOH et al., 2005, SORENMO et al., 2009). No Brasil, a prevalência das neoplasias malignas variou entre 60% e 91% (DE NARDI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; FELICIANO et al., 2012). Desse modo, estes dados podem ser explicados devido à alta prevalência de neoplasias malignas nos estudos realizados no Brasil e também o tempo prolongado entre o aparecimento do tumor e avaliação clínica (OLIVEIRA et al., 2003). Há evidências de que o tempo de evolução prolongado possibilita a progressão de tumores benignos para malignos (SORENMO et al., 2009).

Entre as neoplasias mamárias malignas observou-se maior prevalência de tumor misto maligno e tubulopapilíferos concordando com o descrito no estudo realizado por Cintra et al. (2014) pela classificação de Moulton (1990). No entanto, no

estudo realizado por Soler et al. (2016) que utilizou a classificação de Goldshimidt et al. (2011), as neoplasias mamárias de maior incidência foram carcinoma complexo e simples. E na classificação proposta por Cassali et al. (2011), o tipo histológico carcinoma em tumor misto é separado, pois o autor conceitua como pouco invasivo e com prognóstico melhor.

Na determinação da área de fibrose tecidual, as imagens analisadas revelaram que este parâmetro foi classificado como severo nas neoplasias mamárias malignas em 45 amostras, seguidas em menor número de fibrose moderada e discreta. Nas neoplasias mamárias benignas a fibrose moderada foi a mais frequente, seguida de discreta e severa, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: Frequência absoluta e relativa (%) da classificação de fibrose das neoplasias mamárias em cadelas nos grupos experimentais, Jaboticabal/SP, 2016.

Neoplasias Malignas	Frequência absoluta	%	Neoplasias Benignas	Frequência absoluta	%
Discreta	05	5,85	Discreta	01	1,17
Moderada	14	16,47	Moderada	12	14,11
Discreta	45	52,94	Discreta	08	9,41
Total	64	75,26		21	24,74

Verificou-se que a porcentagem de fibrose classificada como discreta, moderada ou severa, nas neoplasias mamárias, entre os grupos experimentais, foi semelhante para tumores malignos e benignos ($p = 0,134$). As neoplasias malignas apresentaram porcentagem média de $58,2 \pm 24,50$ e as neoplasias benignas o valor médio foi de $49,9 \pm 19,10$.

Em relação ao tempo de evolução das neoplasias mamárias, foi observado que o surgimento dos nódulos ocorreu em um período que variou de um a 36 meses. Para as neoplasias mamárias benignas, o tempo médio de evolução foi de 7,76 meses e para as malignas o tempo médio foi de 7,06 meses.

Quando foi analisada a porcentagem de fibrose nos diferentes tipos histológicos de tumores mamários encontrados no presente estudo, observou-se acúmulo de

fibrose classificada como severa demonstrada pela coloração Tricômico de Masson, especialmente nos tipos histológicos carcinoma *in situ* e tumor misto maligno. As áreas de fibrose foram caracterizadas por meio de programa de análise de imagens (Figura 5).

Em relação a porcentagem de fibrose e o tempo de evolução das neoplasias mamárias não foi observada diferença estatística ($p = 0,14$) e houve correlação negativa entre esses dois parâmetros ($p = 0,008$, $r = -0,3$). Portanto, de acordo com estes resultados, a porcentagem de fibrose e o tempo de evolução não indicaram severidade ou maior presença de fibrose nas neoplasias mamárias, pois a porcentagem de fibrose apresentou-se de maneira discreta nas amostras que apresentavam menor tempo de evolução. Entretanto, a porcentagem de fibrose correlacionou-se positivamente com o grau histopatológico dos tumores ($p = 0,035$, $r = 0,23$) e, esta última variável apresentou correlação positiva com a idade ($p = 0,003$, $r = 0,32$).

Histologicamente, fibroblastos e fibras de colágeno dentro de uma área de fibrose estão dispostos em padrões irregulares, associados a maior celularidade e / ou colagenização de fibroblastos. Como esta arquitetura densa do tecido afeta o tumor ainda não está claro. Novas técnicas de imagem não invasiva, como a elastografia, estão sendo exploradas para a avaliação do colágeno *in vivo* e podem permitir a identificação e delineamento de um foco fibrótico dentro de uma neoplasia mamária (BROWN, et al., 2003).

Corroborando os autores Soler et al. (2016), houve baixo número de amostras de tumores benignos em comparação com os tumores malignos. Este fato pode explicar a falta de diferença significativa observada entre os dois grupos de tumores e os demais parâmetros utilizados neste estudo. A heterogeneidade das neoplasias mamárias caninas, juntamente com o tamanho limitado de corte, tornou a interpretação dos dados mais difícil e amostras maiores poderiam gerar dados mais significativos. Mesmo assim, nos resultados do presente estudo, verificou-se a presença da correlação positiva do grau histopatológico com a porcentagem de fibrose das neoplasias mamárias malignas, corroborando aos achados observados por McPhail e Robinson (2010), em ratos.

McPhail e Robinson (2010) relataram correlação positiva entre a fibrose e as neoplasias mamárias em ratos quando utilizaram a coloração Picrosirius Red sugerindo que as neoplasias induzidas por NMU (N-Metil-N-Nitrosureia) também apresentaram maior quantidade de fibrose. Este fato demonstra que a fibrose é clinicamente relevante, já que tem sido demonstrado que os carcinomas mamários ductais invasivos com presença de fibrose possuem características mais agressivas do que aqueles que não têm (HASEBE et al., 1996).

De acordo com McPhail e Robinson (2010), a presença de fibrose no tecido tumoral é considerada característica histopatológica associada ao mau prognóstico nas neoplasias mamárias. Embora existam outros marcadores histopatológicos que são usados para avaliar tumores malignos, foi sugerido que a presença de fibrose em carcinomas originados da reação exagerada do estroma tumoral, cujos principais componentes são fibroblastos e colágeno, poderia ser utilizada como fator prognóstico nas neoplasias mamárias.

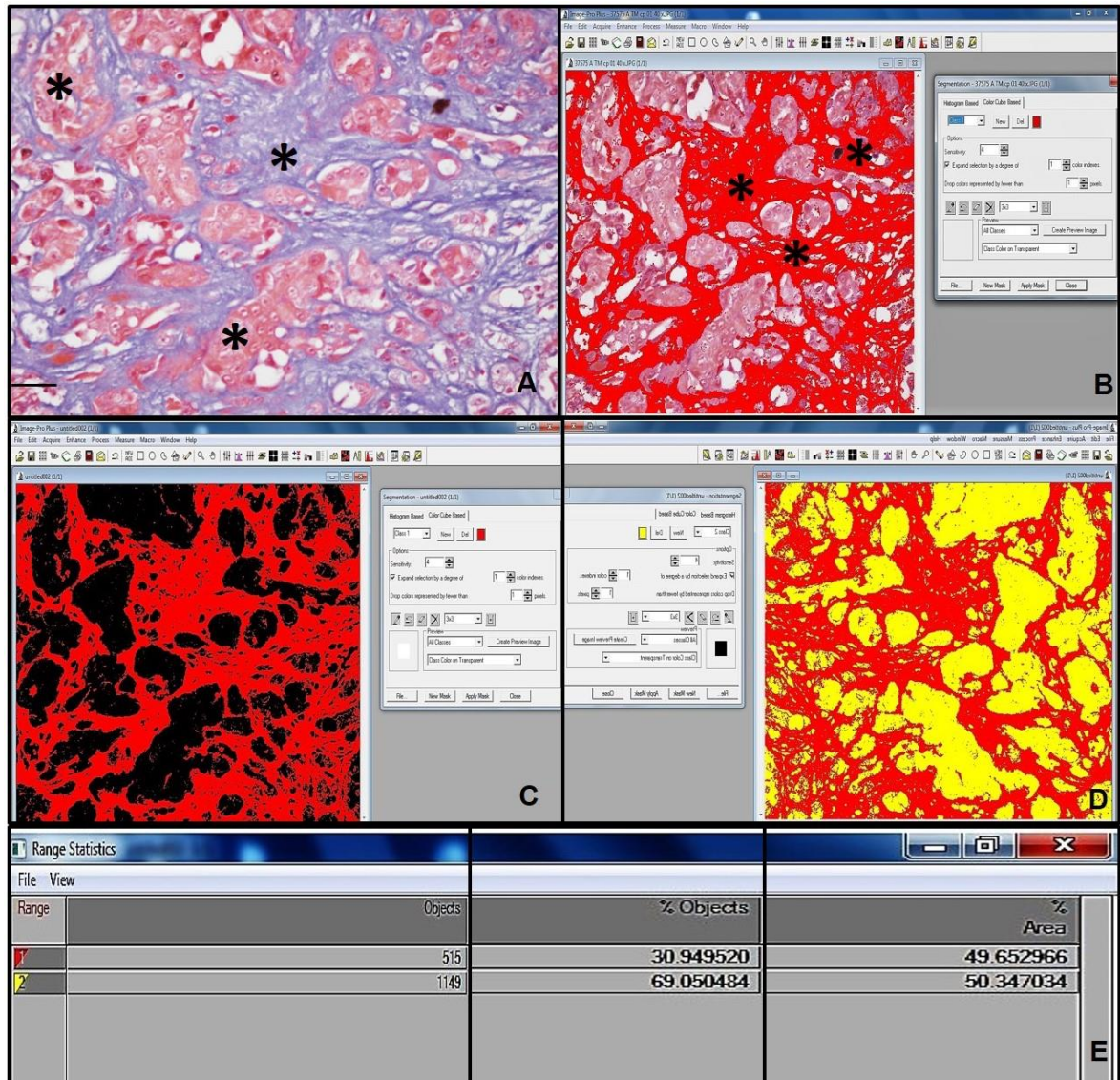


Figura 5: Fotomicrografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela. **A:** Carcinoma sólido(*), TM, barra 100 µm. **B:** Fotografia de preparação histopatológica em glândula mamária de cadela através do programa Image-Pro Plus16. Área de fibrose marcada através do programa de imagem Image-Pro Plus 16 (*). **C** Análise da área de fibrose marcada (vermelho). **D:** Cálculo da área de fibrose moderada marcada (vermelho) e da coloração de fundo (amarelo). **E:** Resultado do cálculo automático da área de fibrose em carcinoma sólido.

Em relação aos diferentes tipos histopatológicos das neoplasias mamárias em cadelas neste estudo, foi observado que os tumores malignos que apresentaram fibrose tecidual considerada severa ($\geq 50\%$ da amostra) por ordem decrescente foram: carcinoma *in situ*, carcinoma em tumor misto, carcinoma sólido, carcinoma complexo, carcinoma tubulopapilífero, exceto o carcinoma de células escamosas que apresentou fibrose moderada (25 - 50% da amostra).

Os tipos histopatológicos benignos neste estudo que apresentaram fibrose tecidual severa foram: tumor misto benigno, adenoma cístico e hiperplasia ductal. Os tipos histopatológicos adenoma tubular, adenoma complexo e hiperplasia lobular apresentaram fibrose moderada (25 - 50% da amostra). E o tipo histopatológico classificado como adenoma complexo apresentou fibrose discreta ($\leq 25\%$ da amostra).

Ao avaliar a porcentagem de fibrose em relação ao diagnóstico histopatológico das neoplasias mamárias, foram observadas diferenças significativas ($p = 0.0284$), conforme demonstrado na Tabela 08.

Tabela 08: Mediana \pm IQR dos valores de fibrose tecidual (%) encontrados nas neoplasias mamárias em cadelas em relação ao diagnóstico histopatológico, segundo a classificação de Misdorp (1999), Jaboticabal/SP, 2016.

Grupos	Mediana \pm IQR
Grupo I – Benigno	
Adenoma cístico	56,30 \pm 0 ^{ab}
Adenoma complexo	56,53 \pm 0,00 ^{abc}
Adenoma tubular	42,46 \pm 2,88 ^{bc}
Hiperplasia ductal	57,75 \pm 6,95 ^{abc}
Hiperplasia lobular	39,32 \pm 13,13 ^c
Tumor misto benigno	63,59 \pm 4,29 ^{ab}
Grupo II – Maligno	
Carcinoma complexo	47,68 \pm 19,15 ^{abc}
Tumor misto maligno	63,42 \pm 14,99 ^{ab}
Carcinoma mamário escamoso	37,64 \pm 6,09 ^c
Carcinoma in situ tubular	73,29 \pm 3,89 ^a
Carcinoma sólido	61,72 \pm 10,47 ^{ab}
Carcinoma tubulopapilífero	51,13 \pm 16,78 ^{abc}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tipos histológicos ($p < 0,05$), pelo teste de Dunns. IQR: \pm faixa interquantil.

No presente estudo, os carcinomas mamários invasivos com focos de fibrose possuem características mais agressivas do que os invasivos sem a presença de fibrose. A presença deste processo está associada ao maior tamanho tumoral, grau histopatológico, atividade proliferativa de células tumorais e necrose. Van Den Eyden et al. (2007) relataram que estudos menores realizados com neoplasias mamárias em mulheres mostraram o significado prognóstico independente da presença de fibrose em pacientes com neoplasia mamária invasiva. Além disso, foi demonstrado que a relação entre fibrose e o tamanho relativo do tumor seria fator prognóstico importante para o paciente.

Em relação ao carcinoma *in situ*, a influência do estroma reativo nas células neoplásicas e vice versa ainda é um tema bastante debatido e não está totalmente esclarecida a maneira pela qual o carcinoma *in situ* permanece localizado contido pela membrana basal ou torna-se invasivo por meio da degradação da mesma (HANAHAN e WEINBERG, 2000; KALLIURI, 2003). Além disso, os fibroblastos do estroma segregam a MMPs ou o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase, que são importantes fatores na progressão tumoral (HASEBE et al., 2000). Portanto, é presumível que os fatores biológicos dos fibroblastos habituais sejam acentuadamente divergentes dos fibroblastos vigentes no foco de fibrose. Isto indica heterogeneidade nas características dos fibroblastos associados ao estroma tumoral tanto quanto das células neoplásicas, o que pode exercer influência em pacientes acometidos por carcinomas mamários.

Desta maneira, foi demonstrado claramente que a presença de fibrose causa diferenças no potencial maligno nos carcinomas invasivos e em outras neoplasias mamárias. A fibrose pertence ao estroma tumoral, indicando que o potencial maligno das neoplasias não depende apenas das características biológicas da célula tumoral, mas também do estroma tumoral. A fibrose consiste em fibroblastos ou fibras de colágeno misturadas com microvasos e a interação destes componentes influencia a progressão de carcinomas mamários com fibrose (HASEBE et al., 2000). A presença de fibroblastos atípicos no estroma tumoral, especialmente em focos fibróticos, está significativamente associada à recidiva tumoral e ao óbito de mulheres com carcinoma mamário ductal invasivo (AHN et al., 2012).

Considerando que a mediana da porcentagem de fibrose nas neoplasias malignas foi de 58%, foram estudadas a sensibilidade e especificidade do teste para estimar a malignidade das neoplasias mamárias nos grupos experimentais deste estudo. O resultado deste teste para a prevalência foi de 75%, sensibilidade de 45%, especificidade de 86%, valor preditivo positivo (VPP) de 90% e valor preditivo negativo (VPN) de 34%. A verossimilidade positiva encontrada foi de 94% e a negativa foi de 24%. Em relação à acurácia do teste o valor encontrado foi de 38%, considerado de baixa acurácia.

Ao avaliar a porcentagem de fibrose em relação aos diferentes tamanhos dos nódulos mamários, verificou-se que o resultado foi estatisticamente similar ($p = 0,52893$), o valor médio para os nódulos T1 foi de $54,93 \pm 21,68$, para os T2 foi de $57,51 \pm 22,69$ e para as massas T3 o valor médio foi de $60,36 \pm 31,63$. Em relação ao tamanho tumoral, não houve correlação positiva entre o tamanho tumoral e os parâmetros porcentagem de fibrose, idade, grau histopatológico e tempo de evolução, comparados separadamente.

Quanto à porcentagem de fibrose e a probabilidade do diagnóstico ser maligno também foi testada por meio de regressão logística binária e estimou-se que a porcentagem de fibrose é preditiva da malignidade das neoplasias mamárias em apenas 46% das massas ($p = 0,074$).

Em mulheres, foi realizado um estudo para esclarecer o significado prognóstico de focos de fibrose em 140 casos de carcinomas invasivos. Nesse estudo, a significância prognóstica da fibrose foi avaliada com os seguintes parâmetros histológicos conhecidos: idade, grau histopatológico; acometimento de linfonodo regional (ausente ou presente), classificação do tamanho, necrose tumoral (presente ou ausente) e quimioterapia adjuvante (nenhuma ou administrada). Foi revelado neste estudo que as taxas de sobrevida global e tempo livre de doença foram significativamente menores nos casos com presença de fibrose do que nos casos ausentes. Estes dados confirmam que a presença e dimensão da fibrose são parâmetros histopatológicos e prognósticos úteis para pacientes com carcinoma lobular invasivo, bem como para carcinomas ductal invasivo (HASEBE et al., 2000).

No que diz respeito aos resultados deste estudo, consideramos que a restrição em relação ao número de amostras utilizadas pode ser um fator limitante. Deste modo,

deve-se preconizar a realização de estudos mais amplos que englobem maior número não só de amostras, mas também de animais de diferentes raças, idade, tipos histopatológicos malignos e benignos, além de utilizar diferentes técnicas de colorações histológicas. Em relação às colorações histológicas convencionais, deve-se admitir que a técnica de imuno-histoquímica permite análise minuciosa das células presentes no estroma tumoral e o padrão de distribuição. No entanto, esta técnica pode apresentar algumas desvantagens em comparação com as colorações histológicas de rotina, quando consideramos que os protocolos são mais complexos, além do alto custo dos diferentes anticorpos e dos reagentes que são necessários para sua realização. O presente estudo forneceu evidências de que a coloração Tricômico de Masson pode representar um método para avaliar a fibrose nas neoplasias mamárias caninas. Portanto, a avaliação criteriosa do estroma tumoral poderá nos fornecer informações do prognóstico de pacientes que apresentarem neoplasias mamárias no futuro, melhorando assim a sobrevida dos pacientes.

7. CONCLUSÃO

O diagnóstico histopatológico existente para as neoplasias mamárias não descreve completamente as características biológicas do estroma tumoral. Para que exista melhora neste aspecto, se faz necessário a avaliação do grau de malignidade das neoplasias mamárias baseadas nas características histológicas do estroma tumoral. Portanto, o exame detalhado do estroma tumoral, além das células neoplásicas tumorais presentes, pode facilitar a previsão do resultado de cadelas acometidas por carcinomas mamários, assim como outros tipos de carcinomas.

Considerando os dados revelados neste estudo, onde não foi demonstrado claramente que a fibrose tecidual adjacente indica malignidade das neoplasias mamárias como fator isolado, a presença de fibrose no estroma tumoral pode ser considerada importante parâmetro de prognóstico histopatológico para as neoplasias mamárias em cadelas. Portanto, mais estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários para elucidar o complexo processo de desenvolvimento fisiopatológico da fibrose nas neoplasias mamárias caninas, bem como o seu impacto nas interações entre o sistema imunológico e doenças crônicas como as neoplasias mamárias.

8. REFERÊNCIAS

AGRA, D.F.I. Contribuição para o estudo clinicopatológico de tumores mamários de cadela: avaliação de 79 casos consecutivos. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, 2011.

AHN, S.; CHO, J.; SUNG, J.; LEE, J. E.; NAM, S. J.; KIM, K. M.; CHO E. Y. The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. **Tumour Biology**, United States, v.33, n. 5, p. 1573-1580, 2012.

AULER, P.; BERTAGNOLLI, AC.; FERREIRA, E.; CAMPOS, G.; DIAS, A.P.M.; CAMPOS, C.B.; CAMPOS, L.C.; CASSALI, G.D. Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. **The Veterinary Quarterly**, Netherlands, v. 31, n. 4, p. 173-177, 2011.

BARR, R. G.; NAKASHIMA, K.; AMY, D.; COSGROVE, D.; FARROKH, A.; SCHAFER, F.; BAMBER, J. C.; CASTERA, L.; CHOI, B. I.; CHOU, Y. H.; DIETRICH, C. F.; DING, H.; FERRAIOLI, G.; FILICE, C.; FRIEDRICH-RUST, M.; HALL, T. J.; NIGHTINGALE, K. R.; PALMERI, M. L.; SHIINA, T.; SUZUKI, S.; SPOREA, I.; WILSON, S.; KUDO, M. WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 2: breast. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 1148-1160, 2015.

BROWN, E.; MCKEE, T.; DITOMASO, E. Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 6, p. 796-800, 2003.

BRYONY, S. W.; ZENA, W. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**, New York, v. 296, n. 5570, p. 1046-1049, 2002.

BURRAI, G.P.; TANCA, A.; DE MIGLIO, M.R.; ABBONDIO, M.; PISANU, S.; POLINAS, M.; PIRINO, S.; MOHAMMED, S.I.; UZZAU, S.; ADDIS, M.F.; ANTUOFERMO, E. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? **Tumor Biology**, Tokyo, v. 36, n. 11, p. 9083–9091, 2015.

CASSALI, G.D. Patologias da glândula mamária. NASCIMENTO E.F.; LIMA RS. (Ed.). Patologia da reprodução dos animais domésticos. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 2, 131-133.

CASSALI, G. D.; GOBBI, H.; MALM, C.; SCHMITT, F. C. Evaluation of Accuracy of Fine Needle Aspiration Cytology for Diagnosis of Canine Mammary Tumors: comparative features with human tumors. **Cytopathology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 191-196, 2006.

CASSALI, G. D. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC Procedure**, London, v. 7, Suppl 2:K6. 2013.

CASSALI et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v.7, n. 2, p. 38-46, 2014.

CHANG, S.C.; CHANG, C.C.; CHANG, T.J.; WONG, M.L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dog with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal American Veterinary Medicine Association**, Ithaca, v. 17, n. 10, p. 1625-9, 2005.

CINTRA, P.P.; PAULA, C.A.T.; CALAZANS, S.G.; SOUZA, J.L.; MAGALHÃES, G.M. Reclassificação e determinação do tipo histológico predominante em neoplasias mamárias caninas do Hospital Veterinário da Universidade de Franca nos anos de 2010 a 2012. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.10, n.18; p. 2067, 2014.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A., PIEKARZ, C.H. Prevalence of neoplasms and kind of treatments in dogs seen in Veterinary Hospital at University Federal of Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DOLBERG, D.S.; HOLLINGSWORTH, R.; HERTLE, M.; BISSEL, M.J. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. **Science**, New York, v. 230, n. 4726, p. 676-678, 1995.

DONNAY I.; RAUIS J.; DEVLEESHIUWER N.; WOUTERS-BALLMAN P.; LECLERCQ G.; VERSTEGEN J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.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**, Oxford, v.19, p. 403-410, 1991.

ELSTON, C.W.; ELLIS. I.O. Assessment of histological grade. ELSTON CW., ELLIS IO. Eds. Systemic Pathology. The breast. London: Churchill Livingstone, 1998, 365-384.

EVANS, H.L.; AYALA, A.G.; ROMSDAHL, M.M. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. **Cancer**, New York, v. 40, n. 2, p. 818-831, 1977.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO A. O.; 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**, London, v.10, n. 256, p. 256-270, 2010.

FELICIANO, M.A.R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p.1094-1100, 2012.

FERREIRA, E.; GOBBI, H.; SARAIVA, B. S.; CASSALI, G. D. Histological and immunohistochemical identification of atypical ductal mammary hyperplasia as a preneoplastic marker in dogs. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 49, n. 2, p. 322-329, 2012.

FIRMO, B. F. Aspectos clínico-epidemiológicos das neoplasias mamárias em cadelas atendidas pela Unesp – Campus de Jaboticabal. 2016. 48p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal – SP.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary Carcinomas with clinical implications: application. Of the human classification. **Virchows Archive Pathology**, Berlin, v.453, n. 2, p. 123-132, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n.1, p. 117-131, 2011.

GUARINO, M.; TOSONI, A.; NEBULONI, M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 40, n. 10, p. 1365-76, 2009.

HANAHAN, D.E.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANBY, A.M.; HUGHES, T.A. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. **Histopathology**, Oxford, v. 52, n.1, p. 58-66, 2008.

HASEBE, T.; TSUDA, H.; HIRORASHI, S. et al. Fibrotic focus in invasive ductal carcinoma: an indicator or high tumor aggressiveness. **Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 87, n. 4, p. 385-394, 1996.

HASEBE, T.; MUKAI, K.; TSUDA, H.; OCHIAI, A. New prognostic histological parameter of invasive ductal carcinoma of the breast: clinicopathological significance of fibrotic focus. **Pathology International**, Carlton South, v. 50, n. 4, p. 263-272, 2000.

HASHIMOTO, S.; YAMAMURA, H.; SATO, T.; KANAYAMA, K.; SAKAI, T. Prevalence of mammary gland tumor of small breed dog in the Tokyo metropolitan area. **Journal of Veterinary Epidemiology**, Rome, v. 6, n. 2, p. 85-91, 2002.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.

IM, K.S.; KIM, N.H.; LIM, H.Y.; KIM, H.W.; SHIN, J.I.; SUR, J.H. Analysis of a New Histological and Molecular-Based Classification of Canine Mammary Neoplasia. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 51, n. 3, p. 549, 2014.

ITOH, T.; UCHIDA, K.; ISHIKAWA, K.; KUSHIMA, K.; KUSHIMA, E.; TAMADA, H.; MORITAKE, T.; NAKAO, H.; SHII, H. Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and others. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v. 67, n. 3, p. 345-347, 2005.

JENSEN-JAROLIM, E.; FAZEKAS, J.; SINGER, J.; HOFSTETTER, G.; OIDA, K.; MATSUDA, H.; TANAKA, A. Crosstalk of carcino embryonic antigen and transforming growth factor- β via their receptors: comparing human and canine cancer. **Cancer Immunology Immunotherapy**, Berlin, v. 64, n. 5, 531-537, 2015.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. **Nature Review Cancer**, London, v. 3, n. 6, p. 422-433, 2003.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Review Cancer**, London, v.6, n. 5, p. 392-40, 2006.

KLOPFLEISCH, R.; SCHÜTZE, M.; GRUBER, A.D. Downregulation of transforming growth factor b (TGF β) and latent TGF β binding protein (LTBP)-4 expression in late stage canine mammary tumors. **The Veterinary Journal**, London, v. 186, n. 3, p. 379-384, 2010.

KLOPFLEISCH, R.; VON EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A.D. Molecular Carcinogenesis of Canine Mammary Tumors: News From an Old Disease. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 48, n. 1, p. 98-116, 2011.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumors. **Veterinary Science**, Oxford, v. 81, n. 2, p. 218-224, 2006.

LAS MULAS, J. M.; MILLA´N, Y.; DIOS, R. A. Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease free Period in Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 42, n. 2, p. 200-212, 2005.

LIU, B.; ZHENG, Y.; HUANG, G.; LIN, M.; SHAN, Q.; LU, Y.; TIAN, W.; XIE, X. Breast Lesions: Quantitative Diagnosis Using Ultrasound Shear Wave Elastography - A

Systematic Review and Meta-Analysis. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 835-847, 2016.

MAGALHÃES, G. M.; TERRA, E. M.; CALAZANS, S. G.; VASCONCELOS, R. O.; ALESSI, A. C. Avaliação da imunomarcção de células-tronco tumorais em carcinossarcomas mamários e carcinomas em tumores mistos em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, p. 455-461, 2014.

MCPHAIL, L.D.; ROBINSON, S.P. Intrinsic susceptibility MR Imaging of Chemically Induced Rat Mammary Tumors: Relationship to Histologic Assessment of Hypoxia and Fibrosis. **Original Research Experimental Studies**, Easton, v. 254, n. 1, 2010

MATOS, A. J.; BAPTISTA, C. S.; GÄRTNER, M. F.; RUTTEMAN, G.R. Prognostic studies of canine and feline mammary tumors: The need for standardized procedures. **The Veterinary Journal**, London, v. 193, n.1, p. 24-31, 2012.

MELE, M.; JENSEN, L. L.; VAHL, P.; FUNDER, J. A. Breast carcinosarcoma: clinical and pathological features. **Breast Disorders**, New York. v. 35, n. 3, p. 211-215, 2015.

MELIN, M.; RIVERA, P.; ARENDT, M.; ELVERS, I.; MURÉN, E.; GUSTAFSON, U.; STARKEY, M.; BORGE, K.S.; LINGAAS, F.; HÄGGSTRÖM, J.; SAELLSTRÖM, S.; RÖNNBERG, H.; LINDBLAD-TOH, K. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumors. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 12, n. 5, 2016.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G., VON SANDERSLEBEN J. Canine malignant mammary tumors III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 10, n. 3, p.241-256, 1973.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1, p.1-59, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**, 4.ed. Ames: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.

MOULTON, J. E. 1990. Tumors of mammary gland. In: MOULTON, J. E (ed) **Tumours in domestic animals**. (3rd Ed). p. 518-552.

MOUSER, P.; MILLER, MA.; ANTUOFERMO, E.; BADVE, S.S.; MOHAMMED, S.I. Prevalence and classification of spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs without clinical mammary disease. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 47, n. 2 p. 265-274, 2010.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI A.P.; RODRIGUES R.; DRIEMEIER D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Science Veterinary**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

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**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OWEN, L. N. The TNM Classification of tumors in domestic animals. 1 ed. Geneva: World Health Organization, 1980.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. 2002. Tumores mamários caninos: novas perspectivas. **Anais Congresso de Ciências Veterinárias**, Oeiras, Portugal p.183-190. (Resumo expandido).

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M.A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; DE LAS MULAS, J.M. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 51, n. 1, p. 127-45, 2014.

PÉREZ-MARTINEZ, C.; GARCIA-IGLESIAS, M.J.; DURÁN NAVARRETE, A.J.; ESPINOSA-ALVAREZ, J.; GARCÍA FERNÁNDEZ, R.A.; LORENZANAROBLES, N.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, S.; GARCÍAMARÍN, J.F. Histopathological and immunohistochemical characteristics of two canine lipid-rich mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical Medicine**, Berlin, v. 52, n. 2, p. 61-66, 2005.

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; ARTNER, F.G. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, New York, v. 159, n. 3, p.165-172, 2012.

PHILIBERT, J.C.; SNYDER, P.W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L.T.; KNAPP, D.W.; WATERS, D.J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2003.

RANIERI, G.; PANTALEO, M.; PICCINNO, M.; RONCETTI, M.; MUTINATI, M.; MARECH, I.; PATRUNO, R.; RIZZO, A.; SCIORSCI, R.L. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumors with special reference to breast cancer: A comparative review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Boca Raton, v. 88, n. 2, p. 293-308, 2013.

RASOTTO, R.; GOLDSCHMIDT, M. H.; CASTAGNARO, M.; CARNIER, P.; CALIARI, D.; ZAPPULLI, V. The Dog as a Natural Animal Model for Study of the Mammary Myoepithelial Basal Cell Lineage and its Role in Mammary Carcinogenesis. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 151, p. 166-180, 2014.

RIBEIRO, L. G. R. et al. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. **Veterinária em Foco**, Salvador, v. 6, n. 2, p.134-139, 2009.

RIBEIRO, G. M.; ROCHA, R. M.; BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D. Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs. **Veterinary Medicine International**, London, v. 2012, Article ID 432763, p. 7, 2012.

RONNOV-JENSEN, L.; PETERSEN, O. W.; BISSEL, M. J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of stroma reaction. **Physiology Review**, Washington, v. 76, n. 1, p. 69-125, 1996.

ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 17, n. 7, 2011.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. W.B. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, p.455-477.

SANCHES, R. C.; REGONATO, E.; ZILLOTTO, L.; VICENTI, F. A.M.; DALECK, C. R. Doenças neoplásicas em cães: estudo retrospectivo de 535 casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2000, Goiânia. Anais. Editora da Universidade Federal do Goiás, 2000. p. 42.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumors: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, London, v. 9, n. 1, 2013.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARAEI, H.; KHADIVAR, F. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumors as a model to study human breast cancer: a Clinico-Cytohistrological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International**, London, v. 13, n. 79, 2013.

SOLEZ, K.; AXELSEN, R. A.; BENEDIKTSSON, H.; BURDICK, J. F.; COHEN, A. H.; COLVIN, R. B et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. **Kidney International**, New York, v. 44, n. 2, p. 411-422, 1993.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B.; GINNEKEN, C. V.; BRANTEGEM, L. V. Canine mammary tumors, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 6, p. 1112-31, 2011.

SOLER, M.; DOMINGUEZ, E.; LUCAS, X.; NOVELLAS, R.; GOMES-COELHO, K. V.; ESPADA, Y.; AGUT, A. Comparison between ultrasonographic findings of benign and malignant canine mammary gland tumours using B-mode, colour Doppler, power Doppler and spectral Doppler. **Research Veterinary Science** 107:141-146, 2016;

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO K. U.; KRISTIANSEN V. M.; COFONE M. A.; SHOFER F. S.; BREEN A. M.; LANGELAND M.; MONGIL C. M.; GRONDAHL A. M.; TEIGE J.; GOLDSCHMIDT M. H. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

THANNICKAL, V. J.; TOEWS, G. B.; WHITE, E. S.; LYNCH, I. I. I. J. P.; MARTINEZ, F. J. Mechanisms of pulmonary fibrosis. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 5, n. 11, p. 395-417, 2004.

VAN DEN EYNDEN, G. G.; COLPAERT, C. G.; COUVELARD, A.; PEZZELLA, F.; DIRIX, L. Y.; VERMEULEN, P. B.; VAN MARCK, E. A.; HASEBE, T. A fibrotic focus is a prognostic factor and a surrogate marker for hypoxia and (lymph) angiogenesis in breast cancer: review of the literature and proposal on the criteria of evaluation. **Histopathology**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 440-51, 2007.

VISAN, S.; BALACESCU, O.; BERINDAN-NEAGOE, I.; CATOI, C. In vitro comparative models for canine and human breast cancers. **Clujul Medical**, London, v. 89, n.1, p. 38-49, 2016.

WITTIG, J. C.; BICKELS, J.; PRIEBAT, D.; JELINEK, J.; KELLAR-GRANEY, K.; SHMOOKLER, B. et al. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. **American Family Physician**, Kansas City, v. 65, n. 6, p. 1123-1132, 2002.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology**, London, v. 214, n, 2, p. 199-210, 2008.

APÊNDICE A

A: Classificação histológica das neoplasias mamárias em cadelas de acordo com Misdorp et al. (1999).

1 Tumores Malignos	2 Tumores Benignos	3 Displasias e hiperplasias mamárias
1.1 Carcinoma <i>in situ</i>	2.1 Adenomas 2.1.1 Adenoma simples 2.1.2 Adenoma complexo 2.1.3 Adenoma basal	4.1 hiperplasia ductal
1.2 Carcinoma complexo	2.2 Fibroadenoma 2.2.1 Fibroadenoma de baixa celularidade 2.2.2 Fibroadenoma de alta celularidade	4.2 hiperplasia lobular 4.2.1 hiperplasia epitelial 4.2.2 adenose
1.3 Carcinoma Simples 1.3.1 Carcinoma tubulopapilífero 1.3.2 Carcinoma sólido 1.3.3 Carcinoma anaplásico	2.3 Tumor misto benigno	4.3 Cistos
1.4 Tipos especiais de carcinoma 1.4.1 Carcinoma de células fusiformes 1.4.2 Carcinoma de células escamosas 1.4.3 Carcinoma mucinoso 1.4.4 Carcinoma rico em lipídeos		4.4 Ectasia ductal
1.5 Sarcoma 1.5.1 Fibrossarcoma 1.5.2 Osteosarcoma 1.5.3 Outros sarcomas		4.5 Fibrose focal
1.6 Carcinosarcoma		4.6 Ginecomastia
1.7 Tumor misto maligno ou sarcoma em tumor misto		