

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA DENSIDADE ESTROMAL E
TIPIFICAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS
ENVOLVIDAS NO CARCINOMA MAMÁRIO DE GATAS**

Mariana Fernandes Jorge

BOTUCATU – SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA DENSIDADE ESTROMAL E
TIPIFICAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS
ENVOLVIDAS NO CARCINOMA MAMÁRIO DE GATAS**

MARIANA FERNANDES JORGE

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, Campus de
Botucatu - SP, para obtenção do título de
doutora em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Júlio Lopes Sequeira

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jorge, Mariana Fernandes.

Avaliação histoquímica da densidade estromal e
tipificação imuno-histoquímica de fibras colágenas
envolvidas no carcinoma mamário de gatas / Mariana
Fernandes Jorge. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Capes: 50501062

1. Mamas - Câncer. 2. Células mesenquimais estromais.
3. Felídeo. 4. Gradação de tumores. 5. Matriz
extracelular. 6. Colágeno. 7. Carcinogênese.

Palavras-chave: Câncer de mama; Carcinogênese; Colágeno;
Felino; Matriz extracelular.

Mariana Fernandes Jorge **Título:** AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DA DENSIDADE ESTROMAL E TIPIIFICAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FIBRAS COLÁGENAS ENVOLVIDAS NO CARCINOMA MAMÁRIO DE GATAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Júlio Lopes Sequeira
Membro do Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka
Membro do Departamento de Clínica Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Ass. Dra. Renee Laufer Amorim
Membro do Departamento de Clínica Veterinária - Patologia FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dra. Maria Luísa Buffo de Capua
Diretora Instituto Bioethicus e Doutora Voluntária no Ambulatório de Acupuntura Veterinária FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Ass. Dra. Ana Cláudia Patrocínio
Membro da Faculdade de Engenharia Elétrica – UFU – Uberlândia/MG

Data da Defesa: 29 de novembro de 2019.

Aos meus pais Antônio Calim Jorge, Leda Fernandes Jorge, e as minhas irmãs, foi o apoio e o amor de vocês desde os primeiros passos do meu ser que me capacitaram para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos amigos queridos e sobrinhos amados que dividem tanto os momentos de felicidade como de dificuldade, manifestando diariamente a importância dos nossos elos.

Ao professor Assistente Doutor Júlio Lopes Sequeira por toda paciência e persistência com a trajetória do nosso trabalho. Obrigada por nossas conversas, sejam as técnicas como as de realização pessoal. Com certeza estarão presentes em diferentes etapas da minha vida.

Ao professor Assistente Doutor Alexandre Hataka que sempre me auxiliou, desde o começo do meu retorno acadêmico. Obrigada por todo seu tempo dedicado, pelas críticas, e pelo ambiente descontraído de trabalho.

À professora Assistente Doutora Renée Laufer Amorim e a professora Assistente Doutora Noeme Sousa Rocha por me acolherem em muitos momentos de dificuldade com o trabalho e suas raízes, além do auxílio de materiais de consumo do laboratório, que viabilizou etapas do processamento de nossas amostras.

A professora Adjunta Doutora Ana Cláudia Patrocínio que me fez compreender sobre a importância dos critérios envolvidos na análise de algumas imagens, outra área de desafio.

Aos colegas de pós-graduação pelas conversas e discussões técnicas, momentos que proporcionaram leveza a momentos intensos desta trajetória. Em especial ao Doutor Carlos Eduardo Fonseca-Alves, e a Doutora Maria Cláudia Lopes da Silva que me orientaram tanto em processos referentes a produção laboratorial, como na compreensão de sua aplicabilidade.

Ao Doutor Rafael Torres Neto pelo auxílio quanto aos entraves surgidos durante os processamentos imuno-histoquímicos. Com acessibilidade dividiu seus conhecimentos embasados em sua ampla experiência.

Ao Doutor Felipe Augusto Ruiz Sueiro e a Universidade de Marília (Unimar) por disponibilizar as amostras de qualidade de carcinoma mamário, o que dá confiabilidade aos resultados.

Aos técnicos Maria Valéria Morales Dalanezi e Maury Raul que estavam dispostos a me orientar e instruir sobre a rotina laboratorial, área que venho explorando dentro da academia.

In memoriam ao meu tio, Professor Adjunto Doutor João Semir, que muito além do exemplo acadêmico, abriu caminhos estreitos que permitem hoje eu ser mais leve e sincera comigo mesma. In memoriam a amiga Adriana Cavallari, que com sua luta e alegria, foi uma das grandes incentivadoras para continuar este trabalho, acreditando na ciência a favor da comunidade.

A Rubia Mitalli Tomacheuski pela parceria, cumplicidade, paciência e amor. Você transformou minha vida, trouxe mais cor aos meus dias. Obrigada por insistir no caminho do meio, e escolher se relacionar, afinal também é um grande desafio.

À Bia, meu amor canino, que esteve presente em todos os momentos deste caminho, com seu amor incondicional, e apoio silencioso. A estrela mais bonita que hoje brilha no céu.

E agradeço a Deus por ser quem sou e estar aqui neste momento.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.O aumento da densidade do parênquima mamário indicado como fator de risco a carcinogênese (C) ou como auxiliar no processo metastatização (M) por métodos diagnósticos (Diag.) mamográficos (MM) e/ou histopatológico (H) segundo diferentes autores.....	23
TABELA 2. Graduação dos carcinomas mamários das gatas.....	38
TABELA 3. Graduação final do Sistema de Nottingham	38
TABELA 4. Anticorpos utilizados nos cortes de tecido de mama de gatas e suas especificações.....	40
TABELA 5. . Tipo e graduação histopatológica de carcinoma mamário em gatas.	45
TABELA 6. Valores de cada uma dos atributos descritos para análise digital das imagens do grupo referência na região periférica do parênquima mamário saudável.....	47
TABELA 7. Valores de cada uma dos atributos descritos para análise digital das imagens do grupo referência na região central do parênquima mamário saudável.....	48
TABELA 8. Valor de kurtosis (Kurt) e entropia (Ent) de cada uma das amostras de carcinoma mamário de gata, segundo idade, tipo e grau histopatológico...	50
TABELA 9. Valor médio de kurtosis (Kurt) e entropia (Ent) do tecido normal e dos carcinomas mamários de gatas, segundo tipo e graduação histopatológico em relação a região.	51
TABELA 10. Valor médio de kurtosis e entropia manifestado tanto pelo tecido saudável como pelos carcinomas agrupados segundo a baixa (grau I e II) e alta (grau III) graduação histopatológica.....	53
TABELA 11. Prevalência das fibras colágenas segundo análise por Picrossirius Red, classificadas quanto a graduação e tipos histopatológicos.	56
TABELA 12. Intensidade de marcação do colágeno I prevalente nas diferentes regiões do carcinoma mamário felino, classificados segundo grau e tipo histopatológico. (IHQ)	60

TABELA 13. Intensidade de marcação do colágeno III prevalente nas diferentes regiões do carcinoma mamário felino, classificados segundo grau e tipo histopatológico. (IHQ)	64
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Amostra do grupo controle. Imagem capturada em campo escuro sob luz polarizada (A). A mesma imagem depois de transformada em 8 bits e retirado os ruídos de fundo (B).....	46
FIGURA 2. Histograma de uma das imagens do grupo controle utilizada para obter as informações calculadas.	46
FIGURA 3. Valores médios para cada uma das variáveis do grupo controle segundo a distribuição. Referência para escolha dos atributos Kurtosis e Entropia como atributos de melhor confiabilidade estatística.	49
FIGURA 4. Segundo tipo histopatológico houve ganho de fibras colágenas na periferia dos carcinomas sólidos em relação ao tecido saudável ($p < 0,01$).	52
FIGURA 5. Segundo grau histopatológico houve aumento da densidade estromal na periferia nos carcinomas de moderada e pouca diferenciação em relação ao tecido saudável ($p < 0,01$).	52
FIGURA 6. Valores médios de entropia obtidos em cada um dos grupos controle, carcinomas de baixo e de alto grau quanto a localização periférica. Valor de $p < 0,01$	54
FIGURA 7. Valores médios de kurtosis em cada um dos grupos controle, carcinomas de baixo e de alto grau quanto a localização central. Valor de $p < 0,01$	54
FIGURA 8. Carcinoma mamário em gatas, coloração Picrossirius Red.(A) Tecido normal; (B) túbulo-papilífero grau I; (C) sólido grau II; (D) cribriforme grau III. Adquiridas com lente de objetiva com 20x aumento.	57
FIGURA 9. Marcação de fibras espessas no estroma de sustentação do tecido mamário normal de gata, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I, segundo distribuição periferia (A) e central (B). Objetiva com 20x aumento.	61
FIGURA 10. Carcinoma mamário em gata de baixo grau, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I. Grande quantidade de fibras marcadas na periferia (A), e fibras espessas bem marcadas ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.	61
FIGURA 11. Carcinoma mamário em gata de alto grau, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I. Ambas distribuições, periférica (A) e central (B)	

com estroma de sustentação bem delimitado pela coloração das fibras colágenas. Objetiva com 20x aumento.	61
FIGURA 12. Tecido mamário normal de gata, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Marcação de fibras delicadas no estroma de sustentação. Moderada marcação na periferia (A), e fraca marcação ao centro (B). Objetiva com 20x.....	
	65
FIGURA 13. Carcinoma mamário em gata bem diferenciado, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Fibras estriadas circundam o foco tumoral com forte marcação na periferia (A). Moderada quantidade de fibras marcadas ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.	
	65
FIGURA 14. Carcinoma mamário em gata de pobre diferenciação, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Moderada marcação de fibras na periferia (A), e forte marcação ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.....	
	65

LISTA DE ABREVIATÖES

PSR – Picrossirius Red

IHQ – Imuno-histoquímica

EMT – transiçāo epitélio-mesenquimal

HE – hematoxilina e Eosina

MEC – matriz extracelular

MET – mesenquimal epitelial

MMPs – metaloproteinases

C – carcinogēnese

M – metastizaçāo

Diag – Métodos Diagnósticos

MM – mamografia

H - histopatológico

OSH – ovariosalpingohisterectomia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Incidência das neoplasias Mamárias na Fêmea Felina.....	17
2.2	Biologia Tumoral e Patologia Comparada.....	18
2.3	Fatores de risco ao carcinoma mamário	19
2.4	Dinâmica estromal do parenquima mamário	20
2.5	Influência hormonal	23
2.6	Diagnóstico das Neoplasias Mamárias de Gatas	25
2.6.1	Histopatologia.....	26
2.6.2	Gradação Histopatológica	27
2.7	Picrossirius Red	28
2.8	Atributos descritores de imagem.....	30
2.9	Imuno-histoquímica.....	32
2.9.1	Colágeno I e III	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1	Picrossirius Red	39
4.2	Técnica Imuno-histoquímica	39
4.3	Análise microscópica.....	40
4.4	Análise quantitativa das imagens coradas pelo PSR.	42
4.5	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Atributos a partir do histograma da imagem binária.....	45
5.2	Picrossirius Red	49

5.2.1	Controle	55
5.2.2	Graduação	55
5.2.3	Tipos histopatológicos	55
5.3	Imuno-histoquímica	58
5.3.1	Colágeno I	58
5.3.2	Colágeno III	62
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO 1	98
	ANEXO 2	99
	ANEXO 3	107

Resumo

JORGE, M. F.: Avaliação histoquímica da densidade estromal e tipificação imuno-histoquímica de fibras colágenas envolvidas no carcinoma mamário de gatas. Botucatu 2019. 106 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O carcinoma mamário em gatas apresenta comportamento clínico agressivo, com fatores biológicos semelhantes aos tipos triplo-negativo e basal do câncer de mama nas mulheres. O aumento na deposição de fibras colágenas com o passar do tempo representa um fator de risco ao seu desenvolvimento. Existe uma interação dinâmica e mútua entre as células neoplásicas e o estroma do microambiente dos tumores glandulares, com alta atividade biológica na periferia em relação ao centro. Este trabalho objetiva identificar a relação entre a densidade estromal das fibras colágenas (tipo I e III) e a agressividade do carcinoma mamário de gatas, nas regiões periférica e central do tecido, e compará-las segundo classificação histopatológica. Grupo controle representa o tecido saudável, e as 31 amostras de carcinoma mamário foram agrupadas segundo tipos histopatológicos (túbulo-papilífero; sólido; cribriforme), graduações (I, II, e III), e baixo e alto grau. As imagens dos cortes histológicos tratados pelo Picrossirius Red, foram avaliadas pelo Image.J[®] para obter valor médio de curtose, e pelo MatLab[®] para entropia. Analisados estatisticamente pelo GraphPad 5 (GraphPad Software Inc[®], La Jolla, CA) ANOVA com variância unidirecional, seguida teste de Bonferroni ($p < 0,01$). As fibras colágenas foram tipificadas e analisadas de forma descritiva. Houve diferença significativa entre os carcinomas e o tecido saudável em ambas regiões, com aumento da forma madura de colágeno III na porção central. Conclui-se que a densidade estromal da mama da gata aumenta no carcinoma tanto na periferia como no centro, tendo relação com a agressividade tumoral.

Palavras-chave: câncer de mama; carcinogênese; matriz extracelular; colágeno; felino.

Abstract

JORGE, M. F.: Histochemical evaluation of stromal density and immunohistochemical typing of collagen fibers involved in feline mammary carcinoma. Botucatu 2019. 106 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Feline mammary carcinoma Breast presents aggressive clinical behavior, with biological factors similar to the triple-negative and baseline types of breast cancer in women. The increase in the deposition of collagen fibers over time represents a risk factor for its development. There is a dynamic and mutual interaction between neoplastic cells and the stroma of the microenvironment of glandular tumors, with high biological activity on the periphery in relation to the center. This work aims to identify the relationship between the stromal density of collagen fibers (types I and III) and the aggressiveness of mammary carcinoma in cats, in the peripheral and central regions of the tissue, and to compare them according to histopathological classification. Control group represents healthy tissue, and the 31 breast cancer samples were grouped according to histopathological types (tubule-papillary; solid; cribriform), gradations (I, II, and III), and low and high grade. The images of the histological sections treated by Picrossirius Red, were evaluated by Image.J® to obtain an average kurtosis value, and by MatLab®, for entropy. Statistically analyzed by GraphPad 5 (GraphPad Software Inc®, La Jolla, CA) ANOVA with one-way variance, followed by Bonferroni test ($p < 0.01$). Collagen fibers are typified and analyzed in a descriptive way. There was a significant difference between carcinomas and healthy tissue in both regions, with an increase in the mature form of collagen III in the central portion. It is concluded that the stromal density of the cat's breast increases in carcinoma both in the periphery and in the center, having a relationship with tumor aggressiveness.

Key-words: breast câncer; carcinogenesis; extracelular matrix; collagen; feline.

1 INTRODUÇÃO

A glandula mamária é formada por alvéolos secretores de leite, sustentados por ductos de conexão de tecido conjutivo, ricos em colágeno, vasos sanguíneos e linfáticos, circunscritos pela membrana basal (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004). Este arranjo permite a nutrição e a defesa do tecido mamário (MUSCHLER; STREULI, 2010; SCHEDIN et al., 2004).

A matriz intersticial da mama é rica em fibras colágenas do tipo I e III (LIPTON et al., 2018) que constituem a matriz extracelular (MEC) responsável por manter a integridade da estrutura física do tecido e modular a sinalização entre as células epiteliais e estromais (SKANDALIS et al., 2014).

Nas fases de puberdade e gestação, a MEC do parenquima mamário adquire características de elasticidade funcional, graças à troca de sinais entre as fibras colágenas, glicoproteínas e proteoglicanos (STERNLICHT, 2005). Durante sua modulação, enzimas proteolíticas específicas denominadas metaloproteinases (MMPs) corroboram com o remodelamento da MEC ao degradar a matriz intersticial (NELSON et al., 2000).

Quando ocorre a mutação genética nas células epiteliais, tais mecanismos fisiológicos induzem interações epitélio estromais cruciais (LI et al., 2016), tanto a carcinogênese (MUSCHLER; STREULI, 2010) como a progressão tumoral (WICHA et al., 1982). As alterações moleculares na MEC acabam favorecendo o microambiente tumoral atuando na proliferação celular; na manutenção do sítio tumoral; na ativação do mecanismo de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*), e na inibição da resposta imune (FERREIRA, 2017; WICHA et al., 1982); além da degradação das fibras colágenas (VIZOSO et al., 2007).

O processo de metástase envolve várias etapas, a invasão local do sítio primário seguida pela sobrevivência na circulação garante o extravasamento tumoral e consequente colonização à distância (PAGET, 1889). A cinética destas etapas depende do tipo neoplásico e do tecido do órgão que será implantado (NGUYEN; BOS; MASSAGUÉ, 2009). O cultivo celular de linhagens de carcinoma mamário de mulheres evidenciou que, o microambiente neoplásico influencia no comportamento celular estromal (PROVENZANO et

al., 2008). Assim, para o processo de invasão ser bem sucedido as interações estromais são essenciais (PSAILA; LYDEN, 2009). Pouco se sabe sobre as interações estromais tanto no tecido saudável como no carcinoma mamário das gatas. Buscar dados que auxiliem na caracterização da glândula mamária para relacioná-los com as diferentes classificações histopatológicas, pode auxiliar na compreensão do envolvimento das fibras colágenas na carcinogênese.

É cada vez mais comum as neoplasias mamárias em pequenos animais, sendo mais frequente nas cadelas (*Canis lupus familiaris*), e mais agressiva nas gatas (*Felis catus*). Indicado como terceira maior incidência dentre a espécie felina (AMORIM et al., 2006; MISDORP, 2008; RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2013), atrás das neoplasias de pele e de tecido mieloproliferativo (OVERLEY et al., 2005). Pelo seu comportamento agressivo há baixa expectativa de vida independente do tratamento instituído (SCIBELLI et al., 2003).

Em cerca de 80% das gatas acometidas pelo carcinoma mamário ocorrem metástases (LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, 2007), com infiltração local e dos tecidos adjacentes (AMORIM et al., 2006). O prognóstico de tempo de sobrevida é correlacionado com o tamanho tumoral do sítio primário, o acometimento ou não dos linfonodos, o estadiamento clínico, a extensão da cirurgia e a graduação histopatológica (MILLS et al., 2015).

A cirurgia representa o tratamento mais aplicado às gatas, sendo indicada a mastectomia bilateral radical e quimioterapia adjuvante (CASSALI et al., 2018). Porém, mesmo instituídos protocolos neoadjuvantes, não há diferença significativa quanto à sobrevida (DE CAMPOS et al., 2015). O diagnóstico precoce ainda é o melhor fator prognóstico (GIMÉNEZ et al., 2010).

Na medicina veterinária, o exame histopatológico é o método diagnóstico mais difundido e padronizado, pré-requisito para indicação dos biomarcadores para imuno-histoquímica (CASTAGNARO et al., 1998a; MATOS et al., 2012; MILLS et al., 2015; MISDORP et al., 1999), técnica largamente utilizada em medicina humana. A falta de sua utilização pode induzir o diagnóstico inadequado dos tumores mamários em animais (SCIBELLI et al., 2003). O emprego de técnicas mais avançadas de diagnóstico permite avaliar eventos favoráveis ao fenótipo invasor, indicadores de prognóstico (RIBEIRO et al., 2013; ZAPPULLI et al., 2014).

O arranjo estrutural do parênquima mamário, a influência hormonal, e a fisiologia de desenvolvimento (ZAPPULLI et al., 2005), assim como os fatores biológicos envolvidos na tumorigênese do carcinoma mamário são semelhantes entre as mulheres e as gatas (MARIA et al., 2005). Em especial os tipos mais agressivos, como o basal e triplo-negativo, sendo a espécie felina o modelo animal mais adequado ao estudo (C.S. et al., 2018; MARQUES et al., 2017; TAMAMOTO et al., 2014; ZAPPULLI et al., 2005), critério de escolha para embasar a literatura deste trabalho.

Graças ao forte aporte vascular que a região periférica recebe, é considerada área de risco à invasão em massas tumorais (KUHL, 2000). Enquanto na região central, a degeneração pela hipóxia leva ao remodelamento da matriz (KESSENBROCK; PLAKS; WERB, 2010). As células neoplásicas interagem com MEC, e utilizam a proteólise do remodelamento a seu favor promovendo a invasão e metástase (WOLF et al., 2007).

O desequilíbrio na degradação das fibras colágenas que compõem a matriz intersticial possui relação com a agressividade tumoral (DE WEVER; MAREEL, 2003). A deposição anormal de colágeno, com aumento focal na densidade estromal é ferramenta tanto ao diagnóstico precoce (PROVENZANO et al., 2008) como ao prognóstico, para o carcinoma mamário em mulheres (DRIFKA et al., 2016).

Os feixes colágenos compostos de folhas e filamentos finos em certo padrão auxiliam o processo de invasão (KOWALSKI; RUBIN; KLEER, 2003), através da orientação espacial (ZHANG et al., 2013). O colágeno de tipo I, por ser responsável pela interconexão como a MEC, é apontado como direcionador da motilidade celular (GRITSENKO; ILINA; FRIEDL, 2012).

O colágeno tipo III, rico no tecido conectivo cicatricial, regula a diferenciação de miofibroblastos (GAY et al., 1975), sendo importante em células de carcinoma mamário para suprimir a adesão, invasão e migração, regulando assim, o estroma, e dificultando o alinhamento do colágeno fibrilar que propicia a invasão (BRISSON et al., 2015).

As alterações da MEC podem ser induzidas por elementos do estroma tumoral (FIELDS, 2013), por fibroblastos, como também pelas próprias células neoplásicas (ARESU et al., 2011). Assim, para estimar adequadamente sobre a

dinâmica estromal, deve ser analisada a distribuição das fibras colágenas de acordo com as regiões periférica e central (QUAIL; JOYCE, 2013).

Caracterizar a avaliação do estroma, pelo processamento digital de imagem, através de técnica de coloração laboratorial histoquímica, pode ajudar o meio científico no futuro. Já a tipificação das fibras colágenas de tipo I e III presentes no estroma das neoplasias mamárias das gatas é possível pelo método imuno-histoquímicos (FIGUEIRA et al., 2015; HUGHES; DOBSON, 2012; MATOS et al., 2012), na intenção de identificar a prevalência as formas maduras de colágeno que estão presentes no tecido saudável e nos carcinomas mamários das gatas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Incidência das neoplasias Mamárias na Fêmea Felina

Nos felinos, as neoplasias de maior frequência são as tegumentares e do tecido mieloproliferativo, sendo a glândula mamária a de terceira maior incidência na espécie e a de maior ocorrência entre as fêmeas (AMORIM et al., 2006; MISDORP, 2008; RUTTEMAN; WITHROW; MACEWEN, 2013). De 80% a 96% dos tumores mamários em gatas são considerados malignos e agressivos, recebendo classificação de carcinomas mamários (HUGHES; DOBSON, 2012). Tal comportamento maligno tem como característica a infiltração local e dos tecidos adjacentes (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Quando isso ocorre, os locais de eleição para a instalação das metástases são linfonodos regionais e pulmões, porém outros órgãos podem ser acometidos como pleura, fígado, glândula adrenal e rins (MORRIS et al., 2008; SOARES et al., 2016a).

Mais de um quarto das gatas com carcinoma mamário apresentam acometimento de linfonodo regional no momento do diagnóstico, presente em cerca de 80% dos casos nos axilares e nos inguinais, e com menor frequência nos linfonodos esternais (WEIJER; HART, 1983). O tempo médio de sobrevivência das gatas com carcinoma mamário é inferior a um ano, sendo a graduação o maior indicador prognóstico (SEIXAS et al., 2011).

A metástase ocorre pela disseminação e/ou infiltração de células neoplásicas por via vascular ou no tecido perineoplásico (AGIOSTRATIDOU et al., 2007). Para que isso ocorra, as células tumorais interagem com as células do estroma e com a MEC, o que leva a liberação e ativação de citocinas e fatores de crescimento, que promovem o desenvolvimento e a manutenção da neoplasia direta ou indiretamente (STAMENKOVIC, 2000). Por representar o estágio sem cura da doença, o processo metastático no câncer de mama é muito estudado nas mulheres (GUNASINGHE et al., 2012).

2.2 Biologia Tumoral e Patologia Comparada

Animais de experimentação estão presentes nas primeiras etapas da pesquisa (fase II) e mesmo para os roedores instituídos como modelo de escolha para o estudo da carcinogênese, são apontadas diferenças fisiológicas no desenvolvimento normal da glândula mamária, assim como no comportamento do carcinoma mamário na espécie (RUSSO; RUSSO, 1996), um limitador ao avanço das pesquisas *in vivo* (HASSAN et al., 2017; RUSSO, 2015).

Para a ciência, o carcinoma mamário espontâneo, tanto em cadelas como em gatas, é apontado como bom modelo ao câncer de mama em mulheres, mas para unificação dos dados, o aprimoramento do conhecimento da carcinogênese nestas espécies se faz necessário (MUNSON; MORESCO, 2007). Para alguns tipos de câncer humano, tais modelos já foram estabelecidos, para a mama, a alta população de fenótipo triplo-negativo nas gatas, indica seu forte potencial para estudos (CANNON, 2015). Tal expressão imunofenotípica acontece em mais de 80% dos carcinomas mamários felinos, negativos ao hormônio estrôgeno, uma particularidade que reforça a indicação da espécie como modelo animal de escolha para os tipos de câncer de mama sem indicação à terapia hormonal, como triplo-negativo e basal (DE LAS MULAS et al., 2000).

Além disto, os fatores biológicos que influenciam o câncer de mama em mulheres são similares aos da felina (MARIA et al., 2005; MATOS et al., 2012), como idade de incidência, fatores de risco, aspectos prognósticos, histopatologia, padrão de metástase e resposta a terapia (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994). Estas características reforçam a espécie felina como modelo animal adequado para o estudo comparativo aos tipos de câncer mama mais agressivo das mulheres (C.S. et al., 2018; MARQUES et al., 2017; TAMAMOTO et al., 2014; ZAPPULLI et al., 2005). Assim este trabalho foi embasada em literatura de carcinomas mamários de mulheres.

2.3 Fatores de risco ao carcinoma mamário

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres estão: aumento da idade, etnia, histórico de menarca, característica estruturais da mama, padrões reprodutivos, uso de hormonios, de álcool e de tabaco, assim como atividade física (WINTERS et al., 2017). O de destaque para este trabalho, a densidade do parenquima mamário, seu declínio ao longo tempo, possui relação com menor risco ao desenvolvimento do câncer de mama em relação aquelas de densidade estável (LOKATE et al., 2013).

Alguns destes fatores, como etnia e idade, já foram indicados como independentes (MCCORMACK; SILVA, 2006), o que mostra a divergência quanto à padronização de tais critérios. Mas, no que diz respeito à densidade estromal mamária, os dados são mais concretos, o aumento significativo (75%) da densidade mamária apresenta risco cinco vezes maior em relação aquelas com lipossustituição progressiva (BYRNE et al., 2001).

O aumento da densidade estromal acontece pela deposição exagerada das fibras colágenas, bem estabelecido como fator de risco ao câncer de mama em mulheres (BOYD et al., 2001; CASE et al., 2017; PROVENZANO et al., 2008; THURFJELL, 2002; URSIN et al., 2005). Na medicina humana a mamografia, ferramenta importante na detecção precoce do câncer de mama (ALOWAMI et al., 2003), representa o exame não invasivo capaz de interpretar o aumento da densidade mamária (MCCORMACK; SILVA, 2006; WINTERS et al., 2017).

Na rotina, o monitoramento da densidade do estroma mamário das mulheres, a mamografia é indicada a partir dos 40 anos de idade (BOYD et al., 2000; BRIGHT et al., 1988; CHECKA et al., 2012; LI et al., 2005). O exame também é utilizado para acompanhamento das pacientes com histórico de carcinoma, pois é nas regiões mais densas que o tumor pode recidivar e/ou invadir (ERNSTER; BARCLAY, 1997; PROVENZANO et al., 2008). Além disto, nestas regiões de alta densidade, o risco de desenvolver um segundo tipo tumoral é três vezes maior, comparado ao estroma com menor concentração de colágeno (HABEL et al., 2004), enfatizando sua importância no diagnóstico e no controle do câncer.

A avaliação da densidade mamária é tão importante na medicina que as grandes organizações internacionais recomendam e indicam a mamografia para rastreamento de nódulos mamários a partir dos 40 anos de idade, com os avanços tecnológico já se relata acurancia no rastreamento da faixa etária dos 30 anos (WINTERS et al., 2017).

2.4 Dinâmica estromal do parênquima mamário

Os eventos presentes no estroma normal, como a neoangiogênese, a infiltração de fibroblastos e de células imunológicas acontecem no constante remodelamento da MEC (DVORAK, 1986). O estroma neoplásico tem a capacidade de apresentar aspectos bem similares ao parênquima saudável o que facilita a progressão tumoral garantindo a heterogenicidade em toda sua extensão (DVORAK, 1986).

Interações moleculares entre o epitélio e o estroma permitem a influencia de um sobre o outro, assim no câncer a mudança do estroma é relacionada à invasão e metástase e representa um *hallmark* (DE WEVER; MAREEL, 2003). Os fibroblastos, principais produtores de colágeno tipo I e III (KARSDAL et al., 2017), como os miofibroblastos são recrutados para efetuar a mudança do componente estromal (DE WEVER; MAREEL, 2003).

As fibras colágenas estão em regiões e com funções distintas, a membrana basal (tipo IV) morfologicamente separa o epitélio do endotélio do estroma adjacente, ja matriz intesticial (tipo I e III) envolve o estroma como um tecido conjuntivo de sustentação, o qual é remodelado durante a tumorogênese (LIPTON et al., 2018). O desenvolvimento do câncer está associada ao enrijecimento do parênquima mamário através da deposição de colágeno na MEC (PROVENZANO et al., 2006).

Em mulheres a capacidade invasiva e metastática das neoplasias mamárias foi diretamente proporcional à quantidade de fibras colágenas (GILKES et al., 2013b; XIONG et al., 2014). À medida que o tumor de mama primário cresce estimula a deposição focal de colágeno, que se reorganiza de acordo com o estroma (LIN et al., 2003). Células tumorais de fenótipo invasor seguem ao longo destas fibras colágenas orientadando-se por elas (PROVENZANO et al., 2006). A quantidade de colágeno no sítio primário já

mostrou que também influencia o número de células tumorais circulantes (GILKES et al., 2013b). Além disso, a alta densidade do parênquima induz um microambiente de hipóxia, outro fator promotor tumoral (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

O tipo de orientação das fibras colágenas também pode favorecer o fenótipo invasivo (ZHANG et al., 2013). A análise da disposição de tais fibras permite avaliar a diferença de densidade do parênquima mamário, permitindo diagnóstico precoce através da mamografia (MCCORMACK; SILVA, 2006).

Devido a grande diferença entre os microambientes de borda e centro, a interpretação de ambas as regiões é importante para que se entenda a dinâmica do estroma tumoral (QUAIL; JOYCE, 2013). A hipóxia tecidual observada ao centro das lesões, além de ser força motriz às células cancerígenas também contribui para seleção de clones mais agressivos (CHOUAIB et al., 2012; FACCIABENE et al., 2011). A periferia, de vascularização rica, apresenta maior atividade biológica, local de maior viabilidade ao processo de invasão (DOWSETT et al., 2011; KUHL, 2000).

A borda ou periferia interage dinamicamente com o estroma de sustentação (GUO; DENG, 2018), e seu aumento em uma lesão, pode ser indicativo de malignidade (MATSUBAYASHI et al., 2000). A hipóxia tecidual ao centro estimula a secreção de fatores quimiotáticos às células de defesa, que são recrutadas até a região periférica, onde sofrem influência de outros promotores tumorais e assim passam a beneficiar o processo de invasão (QUAIL; JOYCE, 2013).

As formas de interação e influência entre borda e periferia, são multivariadas como citado acima. Graças a esta mutualidade entre estes microambientes, as células tumorais que circundam o tumor promovem os estágios de iniciação, progressão, metástase, além de possuir relação com quimiorresistência em tumores sólidos (TURLEY; CREMASCO; ASTARITA, 2015). Por se tratar de parênquima glandular, a falta de padronização da distribuição periférica e central do estromal dificulta a interpretação dos resultados, e mais ainda, limita a comparação com o tecido normal (BAUMAN et al., 2014). Assim todas as amostras do trabalho, incluindo o tecido mamário normal das gatas foram analisados segundo a distribuição periférica e central.

As fibras reticulares podem ser quantificadas e tipificadas,

respectivamente, por diferentes técnicas laboratoriais, como a histoquímica (JUNQUEIRA, 1979) ou a imuno-histoquímica (VAN KUPPEVELT; VEERKAMP; TIMMERMANS, 1995). A utilização dos anticorpos é realizada com a finalidade de especificar e padronizar em diferentes espécies e tecidos (AUGSBURGER; HENZI, 2008; TEKGUL et al., 1996), sendo raros os trabalhos com mama de gata.

A Tabela 1 traz algumas citações de literatura que avaliam atuação do aumento da densidade do parênquima mamário na carcinogênese em diferentes espécies, induzido pelo ganho tanto de células epiteliais (Ep) como estromais (Est).

TABELA 1. O aumento da densidade do parênquima mamário indicado como fator de risco a carcinogênese (C) ou como auxiliar no processo metastatização (M) por métodos diagnósticos (Diag.) mamográficos (M), ou histopatológico (H), ou IHQ, ou Ressonância (R), segundo diferentes autores.

Espécie	Celularidade	Ação	Diag.	Autor
Mulher	Ep. e estr.	C	M	(LOKATE et al., 2013)
Mulher	Ep. e estr.	C	M	(MCCORMACK; SILVA, 2006)
Mulher	Ep. e estr.	C	M	(VACEK; GELLER, 2004)
Mulher	Ep. e estr.	C	M	(BYRNE et al., 1995)
Mulher	Ep. e estr.	C	M e H	(BYRNE et al., 2001)
Mulher	Ep e Est.	C	M	(BOYD et al., 2001)
Cadela	Est.	C	H	(CASE et al., 2017)
Roedor	Est	C	H	(PROVENZANO et al., 2006)
Roedor	Est	M	H	(PROVENZANO et al., 2008)
Mulher	Ep e Est	C	M	(THURFJELL, 2002)
Mulher	Est	C	M	(URSIN et al., 2005)
Mulher	Ep e Est	C	M e H	(LI et al., 2005)
*	Est	M	H	(GOPINATHAN et al., 2015)
Roedor	Est	M	H	(WEGNER et al., 2017)
Mulher	Ep e Est	C	M	(CHECKA et al., 2012)
-	Est	M	R	(FRIEDL; WOLF, 2003)
-	Est	M	R	(QUAIL; JOYCE, 2013)
Roedor	Est	C	IHQ	(GILKES et al., 2013b)
Roedor	Est	M	IHQ	(ZHANG et al., 2013)
**	Est	C	H	(DRIFKA et al., 2016)
Mulher	Est	C	IHQ	(GUO et al., 2001)

- Homem – Diversos tecidos

*Homem – Carcinoma de células escamosas de cavidade oral

**Homem – Pâncreas

2.5 Influência hormonal

O ciclo estral da mulher é, em média, 28 dias (WOJTYS et al., 1998), e as alterações que ocorrem no estroma durante o ciclo são muito semelhantes as já relatadas em cabras (PAZUELLO, 2003).

O estrógeno, a progesterona, a prolactina e os hormônios do crescimento, afetam o crescimento do parênquima mamário tanto no tecido normal como no neoplásico (GIMÉNEZ et al., 2010; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). A exposição prolongada e repetitiva aos esteroides sexuais fisiológicos pode levar ao acúmulo de erros genéticos e contribuir ao desenvolvimento tumoral (OVERLEY et al., 2005). A ação contínua dos fatores de crescimento influencia na evolução, tanto da hiperplasia inicial para o estágio pré-neoplásico, como para o carcinoma invasivo (OVERLEY et al., 2005).

Dentre os biomarcadores mais utilizados para definir o padrão imunofenótipo do carcinoma mamário em gatas, o mais significativo é o fator de crescimento epidermal - Her-2, super-expressado nos tipos de comportamento agressivo, em estudo para representar prognóstico (MILLANTA et al., 2005).

Gatas não submetidas à ovariossalpingohisterectomia (OSH) possuem probabilidade sete vezes maior de desenvolver a doença (MORRIS, 2013). O procedimento cirúrgico tem caráter profilático quando a paciente felina é submetida antes de um ano de idade (OVERLEY et al., 2005), embora um estudo antigo afirme que, há cerca de 15% de risco em gatas castradas após oito meses de idade (HAYES; MOONEY, 1985).

A exposição à progestágenos também é considerado um dos fatores de risco ao desenvolvimento do carcinoma mamário nas gatas, além dos representados pela influência hormonal fisiológica (OVERLEY et al., 2005). O uso de progestágeno como método anticoncepcional pode levar da hiperplasia ao carcinoma mamário, dependendo da frequência e dose administradas (ROMAGNOLI, 2015).

Outros estudos enfatizam a forte relação entre o uso de progestágeno e o desenvolvimento de tumores mamários em gatas (AMORIM et al., 2006; HAYES; MOONEY, 1985; MISDORP W, ROMIJN A, 1991; MISDORP et al., 1999; TAMADA et al., 2003; TOMLINSON et al., 1984). Seu potencial como agente promotor foi enfatizado ao observar o desenvolvimento neoplásico em gatos machos castrados, que receberam doses contínuas e repetitivas do hormônio (JACOBS et al., 2010).

Em mulheres, o envolvimento hormonal é estabelecido, inclusive está incluso nos fatores de risco (STERNLICHT, 2005). Foi comprovado que o uso

da terapia hormonal durante menopausa agrava o aumento da densidade estromal, o que pode induzir a neoplasia (RUTTER et al., 2001).

2.6 Diagnóstico das Neoplasias Mamárias de Gatas

Em medicina veterinária, o exame histopatológico é o método de eleição para o diagnóstico definitivo dos diferentes tipos de neoplasia e permite: a tipificação morfológica, graduação tumoral, avaliação das margens cirúrgicas, e detecção do envolvimento de linfonodos regionais (CASTAGNARO et al., 1998a; MISDORP, 2008; MISDORP et al., 1999), que associado estadiamento clínico embasam a escolha da conduta clínica (MATOS et al., 2012).

A primeira classificação histopatológica internacional de tumores mamários de animais domésticos foi proposta em 1974 por Hampe & Misdorp. Após seis anos a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o segundo ponto de classificação, o estadiamento clínico ou método TNM, onde T - tamanho tumoral; N – linfonodos regionais acometidos; e M – metástase à distância (OWEN, 1980). A semelhança do que acontece com outras neoplasias, o T de mama de gatas é considerado um fator prognóstico independente (OVERLEY et al., 2005), com influência direta sobre o prognóstico, com carcinomas < 3 centímetros associados a melhor taxa de sobrevida se comparado aos de maiores (MORRIS, 2013).

Os componentes que dão origem as neoplasias mamárias são diferentes entre si, tumores benignos (como os adenomas) têm como componente celular original a hiperplasia ductal, enquanto as lesões malignas são decorrentes da proliferação de lóbulos, que tendem a crescer não só em tamanho como também em volume (*adenosis*) (HUGHES; DOBSON, 2012).

Com base no laudo histopatológico se faz a escolha dos marcadores imuno-histoquímicos adequados (MATOS et al., 2012; MILLS et al., 2015). A partir deste material, a técnica imuno-histoquímica revela detalhes individuais do comportamento tumoral através da interpretação da imunomarcção, o que identifica fatores prognósticos e preditivos (HUGHES; DOBSON, 2012; MATOS et al., 2012).

2.6.1 Histopatologia

O exame histopatológico utiliza a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) como padrão na rotina laboratorial, permitindo não só o diagnóstico definitivo como a tipificação morfológica, graduação da neoplasia, avaliação das margens cirúrgicas e detecção do envolvimento de linfonodos regionais, além de possibilitar o emprego de técnicas mais avançadas, como marcadores imuno-histoquímicos (GOLDSCHMIDT et al., 2011; MATOS et al., 2012; MILLS et al., 2015; MISDORP, 2008; MISDORP et al., 1999; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013).

No passado, os tumores mamários nas gatas eram classificados como adenomas ou adenocarcinomas, por serem derivados do epitélio glandular, sendo esta classificação baseada principalmente na morfologia descritiva e não na histogênese da neoplasia (HAMPE; MISDORP, 1974). Posteriormente, as classificações que foram propostas para as cadelas passaram a incluir padrões que se correlacionam com o prognóstico, enquanto que para os gatos domésticos, por falta de dados que permitissem o mesmo tipo de abordagem, os padrões morfológicos continuaram prevalecendo (MISDORP et al., 1999).

O subtipo complexo é comum nas cadelas, relacionado com menor agressividade e melhor prognóstico, mas em gatas o principal subtipo histopatológico é o simples que deriva do epitélio luminal dos ductos e alvéolos mamários (ZAPPULLI et al., 2014).

O carcinoma inflamatório é pouco frequente e possui relação com o carcinoma papilar (MORRIS, 2013). De forma geral, os carcinomas mamários mais diagnosticados nas gatas são os de classificação túbulo-papilífero, sólido, e cribriforme (SEIXAS et al., 2011).

A invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos é esperada nos tumores indiferenciados e permite a disseminação das células neoplásicas e posterior instalação a distancia, como em linfonodos regionais (BETZ et al., 2012; GOLDSCHMIDT et al., 2011; MATOS et al., 2012; MISDORP, 2008; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; YAMAGAMI et al., 1996). O que também é analisado no exame de histopatologia.

Neste estudo os carcinomas considerados são descritos como de maior incidência de acometimento, classificados segundo seu arranjo tecidual, por

critérios morfológicos em túbulo-papilífero, sólido e cribriforme (MISDORP et al., 1999).

2.6.2 Graduação Histopatológica

O grau é a principal ferramenta diagnóstica do laudo histopatológico, e faz referência à diferenciação celular (BETZ et al., 2012). Compara a semelhança entre as células tumorais e as células do tecido original, através do grau de diferenciação (GOLDSCHMIDT et al., 2011; MISDORP, 2008; YAMAGAMI et al., 1996). Assim os carcinomas mais agressivos tendem a ser menos diferenciados, sendo atribuídos a eles graus mais elevados (MILLS et al., 2015; SEIXAS et al., 2011).

Também é uma avaliação embasada em características morfológicas da lesão, e adota como critérios o grau de diferenciação celular, o número e o aspecto das figuras de mitose, não levando em consideração o padrão de crescimento tumoral, sendo a baixa graduação - grau I representa o tumor mais diferenciado, o grau II o tumor moderadamente diferenciado e o III o pouco diferenciado (ELSTON; ELLIS, 1991; GOLDSCHMIDT et al., 2011). Assim, se espera que o tempo de sobrevida seja inversamente proporcional ao grau, ou seja, quanto maior o grau menor o tempo de sobrevida (DE CAMPOS et al., 2015).

O sistema de graduação das neoplasias, segundo Elston & Ellis (1991), originariamente elaborado para os tumores de mama de mulheres é o mesmo utilizado para os carcinomas mamários na espécie felina (SEIXAS et al., 2011), e possui relação com o prognóstico da doença (BETZ et al., 2012; ELSTON; ELLIS, 1991; MILLS et al., 2015; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Além da graduação, a invasão ou embolia vascular, outros critérios analisados pelo exame histopatológico, também possui relação com o prognóstico, indicativo de sobrevida (WINTZER et al., 1991) quando analisado a parte e não incorporado ao sistema de classificação (CASTAGNARO et al., 1998).

Perante os critérios de classificação, a invasão vascular ainda não foi padronizada, o que limita a obtenção de dados (CALIARI et al., 2014). O estudo que sugere a imunofenotipagem para o carcinoma mamário em gatas

(SOARES et al., 2016a)(SOARES et al., 2016b) utiliza a metodologia de graduação sugerida por Mills e colaboradores (2015), enquanto o consenso específico de neoplasia mamárias em gatas (CASSALI et al., 2018) preconiza o Sistema de Nottingham (ELSTON; ELLIS, 1991), método mais utilizado nas pesquisas (CASSALI et al., 2018; DE CAMPOS et al., 2015; FIGUEIRA et al., 2014; PEÑAFIEL-VERDU et al., 2012; ZAPPULLI et al., 2014).

Pelo exame histopatológico, a graduação representa melhor o prognóstico do carcinoma mamário felino em relação à tipificação (SEIXAS et al., 2011). O agrupamento embasado na classificação de baixo (grau I e II) e alto grau (grau III), foi utilizado em estudo sobre critérios prognósticos para o carcinoma mamário tanto em mulheres (PETRIC et al., 2014), como em gatas (CASTAGNARO et al., 1998a, 1998b).

A tendência é de que, à medida que os estudos avançam para a espécie felina, boas perspectivas se abram para a medicina comparativa principalmente para os tipos mais agressivos do câncer de mama de mulheres (PROVENZANO et al., 2006; TAMAMOTO et al., 2014).

2.7 Picrossirius Red

Como descrito anteriormente, há forte influência do arranjo tecidual com a agressividade e capacidade de invasão tumoral. No carcinoma da mama, as propriedades promotoras de invasão vinculadas ao colágeno fibrilar são aumentadas, quando proteínas pró-migratórias são depositadas no arcabouço da MEC (GRITSENKO; ILINA; FRIEDL, 2012).

Em diferentes tipos de carcinoma, a reticulação defeituosa das fibras colágenas foi relacionada ao processo de invasão (STETLER-STEVENSON, 1996), facilitado pela proteólise desenfreada induzida pelas enzimas da MEC (KAUPPILA et al., 1999a).

Os fibroblastos produzem as MMPs no estroma mamário, e sua alta expressão está associada à capacidade metastática (KANG et al., 2003; PRZYBYLOWSKA et al., 2006; VIZOSO et al., 2007). A degradação do colágeno tipo I, o mais abundante no tecido conjuntivo, acontece pela metaloproteinase-1, também a mais expressiva entre as MMPs

(BRINCKERHOFF; RUTTER; BENBOW, 2000), demonstrando mais um influenciador do remodelamento da MEC.

O fenômeno de transição para a malignidade com enfoque na desmoplasia ou fibrose tumoral, induzida pelo aumento da deposição destas duas fibras colágenas, reforça a importância dos fibroblastos (KALLURI, 2016; THEOCHARIS et al., 2016). Foi observado que, na mutação do carcinoma mamário para ductal invasivo, o processo de reticulação lento e pouco eficaz resultou no acúmulo das fibras colágenas, o que atribui capacidade invasora (PEYROL et al., 1997).

Nos mamíferos, as moléculas de colágeno estão organizadas no tecido com orientação paralela, ricas em bases aminoácidos e com forte tropismo por corantes ácidos. O aprimoramento da técnica de microscopia com luz polarizada, através da birrefringência, permite a identificação de estruturas colagenosas pelo método do Picrossirius Red (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Para adequada interpretação dos resultados, a espessura do corte do tecido é fundamental e deve respeitar o padronizado (cinco micrometros), o que permite assegurar a birrefringência correta das fibras colágenas (JUNQUEIRA; MONTES; SANCHEZ, 1982).

Estudos utilizando microscopia eletrônica e histoquímica comprovaram a presença de dois tipos de colágeno separados em compartimentos diferentes e em estruturas distintas, como nervos (JUNQUEIRA, 1979; MONTES; BEZERRA; JUNQUEIRA, 1984), artérias (CARRASCO et al., 1981) e pele (JUNQUEIRA; MONTES, 1983).

A coloração histoquímica PSR, permite a avaliação das fibras colágenas segundo seu arranjo e espessura, indicada para diferenciação das fibras colágenas de tipo I e III. Importante considerar a localização morfológica e a intensidade de birrefringência para interpretar o exame (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Por apresentar fibras espessas, o colágeno tipo I é fortemente birrefringente e de coloração avermelhada, enquanto o colágeno tipo III possui características adelgadas, com a birrefringência de coloração esverdeada (MONTES et al., 1980). Geralmente são classificadas como fibras reticulares (MONTES, 1996). As do tipo II não se organizam em fibras, manifestando fraca birrefringência e coloração variável, assim a localização anatômica é a principal referência, esperada sua presença nas

cartilagens hialina e elástica (ZAMBRANO NZ, MONTES GS, SHIGIHARA KM, SANCHEZ EM, 1982).

Assim a diferenciação é feita pela espessura e densidade do tecido, o que garante a birrefringência adequada, graças a grande quantidade de carboidratos que constituem as fibras colágenas (MONTES et al., 1980). O uso desta técnica laboratorial de coloração se mostrou eficaz para analisar o tecido conjuntivo (BAUMAN et al., 2014). Através da densidade estromal um tecido lesionado, pode-se diferenciar o processo de cicatrização de uma patologia crônica (RICH; WHITTAKER, 2005). Da mesma forma, em parênquimas neoplásicos glandulares, a densidade estromal também se apresentou alterada ao se comparar com o tecido saudável (GABRIEL et al., 2019; JEROME et al., 2018).

Para gatas há apenas uma descrição sobre a utilização do exame de imagem de parênquima mamário, com o intuito de avaliar as alterações fisiológicas de condições funcionais da glândula (PAYAN-CARREIRA; MARTINS-BESSA, 2008), método ainda pouco explorado.

No diagnóstico e prognóstico das lesões mamárias, a técnica de PRS já se mostrou eficaz tanto em mulheres (DRIFKA et al., 2016) como em animais (WEGNER et al., 2017). E a análise digital de pixels das imagens adquiridas de carcinoma mamário de mulheres foi utilizada para obter a densidade das fibras colágenas estromais (KAKKAD; JACOBS; GLUNDE, 2012).

Como não há uma padronização, quanto à análise cromatográfica para o Picrossirius Red no tecido mamário de gatas, a técnica de processamento de imagem digital aplicada foi embasada na aplicada para outros tecidos (BAUMAN et al., 2014; RICH; WHITTAKER, 2005; SCHNEIDER et al., 2017).

2.8 Atributos descritores de imagem.

No meio científico, o processamento de imagens passa por análise qualitativa, que vai desde a aquisição da imagem até sua segmentação, seguida por análise quantitativa e classificação de imagem (PRATT, 2001).

A operação de Segmentação procura isolar regiões de acordo com propriedade semelhantes dos pixels, formando grupos. A obtenção de imagem binária representa uma das operações de Segmentação mais comum (SCURI,

1999). Os atributos obtidos a partir das imagens binárias são de grande utilidade para operações morfológicas (VAN DEN BOOMGAARD; VAN BALEN, 1992).

A etapa de Extração de Atributos permite olhar para estas regiões agrupadas e calcular uma série de medidas numéricas que as descrevam, como propriedades geométricas (área, centro de gravidade, largura máxima e mínima), relacionados à forma, propriedades de luminância (moda, média, mediana, desvio padrão); entre outros atributos de significância estatística como *skewness* e *kurtosis* (SCURI, 1999).

As medidas de luminância podem ser extraídas através do histograma da imagem, um gráfico de frequência de cores da imagem, calculado a partir de uma função de densidade probabilidade (PDF- do inglês, *Probability Density Function*). Assim é construído um gráfico de frequência onde no eixo X estão os níveis de cinza prováveis daquela imagem e no eixo Y estão as frequências de pixels para cada nível de cinza presente na imagem (FILHO; NETO, 1999).

A partir do histograma é possível extrair atributos de estatística de primeira ordem, tais como: média de níveis de cinza da imagem, que pode ser interpretado como brilho médio da imagem, desvio padrão dos tons de cinza da imagem, que pode ser interpretado como uma medida de contraste, onde, quando maior o desvio padrão maior a diferença de tons de cinza entre regiões adjacentes da imagem, moda do histograma, que representa a maior ocorrência em pixels em um nível de cinza da imagem, e por fim, a mediana que representa o nível de cinza mediano, ou seja, aquele que ocorre na imagem e é capaz de indicar uma divisão entre os tons mais escuros e mais claros, porém também está relacionado a significância de uma região dentro da imagem (FILHO; NETO, 1999).

Ainda sobre atributos estatísticos, tanto a *skewness* como a *kurtosis* são atributos que descrevem a distribuição, aplicada a dados multivariados, com propriedades que contribuem para confiabilidade do teste T (MARDIA, 1970).

Para análise de imagens de fundo escuro, a *skewness* já se mostrou significativa (CAMBAZA; KOSEKI; KAWAMURA, 2018). A distribuição é considerada simétrica quando o valor de inclinação for zero, e assimétrica positiva quando a inclinação da cauda do histograma é para lado direito, ou assimétrica negativa com inclinação à esquerda da média (KIM, 2013). A

inclinação da cauda do histograma está relacionada com brilho e contraste de objetos na imagem (PRATT, 2001).

A média calculada pela combinação das caudas dividida pela faixa central da distribuição representa o atributo *kurtosis* (CONSULTING, 2016), onde a planicidade da distribuição amostral em relação à curva de normalidade, a referencia normal é zero, negativa quando a distribuição apresenta caudas leve, e positiva exibem as caudas mais altas (BROWN, 1997).

A entropia é o limite mínimo de representação de um pixel, obtido ao explorar a redundância da codificação, dependente do número de bits (FILHO; NETO, 1999). O valor zero representa uma distribuição organizada e certa, com variação de mais ou menos 1 para interpretação estatística, por coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman (ORLHAC et al., 2016).

Como atributo utilizado para analisar a textura das imagens, a entropia, através de uma matriz de correlação, quantifica os tons de cinza e a ligação entre eles (HARALICK; SHANMUGAM; DINSTEIN, 1973). Representa confiabilidade estatística, e já se mostrou mais eficaz do que *skweness* e *kurtosis* para demonstrar a densidade tecidual do parênquima mamário de mulheres em exames de acompanhamento (ROCKINGER; JONDEAU, 2002), o que reforça a importância da escolha da entropia como atributo para analisar as imagens do tecido mamário das gatas.

Teoricamente, há infinitas formas possíveis de manipulação e análise de imagens, extraídas a partir de tipos diferentes de operações computacionais (FILHO; NETO, 1999). Para uma classificação mais apurada se indica a combinação de diferentes atributos, mas a seleção adequada dos algoritmos, não só aperfeiçoa o processo, como confere eficácia pra cada um dos atributos em separado (MAINI; AGGARWAL, 2010).

2.9 Imuno-histoquímica

Com os avanços no diagnóstico anatomopatológico houve o surgimento de procedimentos e técnicas modernas, com a finalidade de facilitar o diagnóstico de doenças infecciosas e neoplásicas nos indivíduos, seja no homem ou nos animais domésticos (RAMOS-VARA, 2005; WEBSTER et al.,

2009). A técnica de imuno-histoquímica, junto da biologia molecular representam os exames mais atuais empregados na rotina diagnóstica, com forte ferramenta auxiliar para o estabelecimento do prognóstico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas (MATOS et al., 2012; NOWAK et al., 2008; RAMOS-VARA et al., 2008).

O estabelecimento do fenótipo tumoral, largamente utilizado na rotina diagnóstica da oncologia humana, visa dados de valor prognóstico e preditivo (DOWSETT et al., 2011). Foi proposto ao constatar o alto número de fenótipos moleculares diferentes dentre as classificações histopatológicas de mesmo tipo tumoral de carcinoma mamário da mulher, o que sugeriu biomarcadores para este tecido (PEROU et al., 2000), com posterior incorporação de marcadores de proliferação (KONTZOGLOU et al., 2012; PETRIC et al., 2014) e validação clínica (FOCKE et al., 2016; TYAGI et al., 2018). Assim, o painel imuno-histoquímico representa uma ferramenta importante para compreender o comportamento neoplásico e assegurar a conduta terapêutica (TYAGI; DHESY-THIND, 2018).

No caso da afecção de glândula mamária na espécie felina, a padronização da expressão de receptores hormonais é dificultada pela heterogenicidade dos casos, explicada pelo fato da maioria das gatas ser esterilizada muito antes do momento da mastectomia (DE LAS MULAS et al., 2000). Assim, não há um painel imuno-fenotípico estabelecido e os biomarcadores são analisados por comparação da expressão molecular entre o sítio primário com o metastático e/ ou o linfonodo sentinela (BEHA et al., 2014).

O uso dessa técnica tem como intenção obter dados mais específicos que permitam tanto um diagnóstico mais apurado, como novas perspectivas de tratamento direcionado (BRUNETTI et al., 2013; MUSCATELLO et al., 2015).

O painel imuno-histoquímico dos carcinomas mamários nas gatas, sugere a caracterização de seis subtipos moleculares diferentes, com varias semelhanças com o câncer de mama em mulheres, modelo natural adequado para o estudo dos subtipos basais e triplos negativos (SOARES et al., 2016). O fenômeno da proliferação celular, um dos mais importantes biomarcadores (Ki-67) é usualmente aplicado na rotina diagnóstica de mulheres (DE AZAMBUJA et al., 2007; KONTZOGLOU et al., 2013). Na veterinária há estudos em cadelas

(MATOS et al., 2012; MORRIS et al., 2008) e gatas (SOARES et al., 2016a), porém com uso restrito comparado a medicina.

2.9.1 Colágeno I e III

O parênquima mamário normal possui uma MEC fibrosa, seu tecido de sustentação é constituído por grande quantidade de colágenos tipos I e III (SCHEDIN et al., 2004). No que diz respeito à organização de tais fibras colágenas no tecido sadio, há semelhança dos resultados independente da técnica utilizada, como na histoquímica (JUNQUEIRA, 1979; MONTES; BEZERRA; JUNQUEIRA, 1984), na imuno-histoquímica (GAY et al., 1975; MEIGEL; GAY; WEBER, 1977) e na bioquímica (TAJIMA et al., 1982) demonstrando mesmo padrão de distribuição em compartimentos distintos.

Ao comparar tumores mamários ao tecido normal em mulheres foram observadas alterações nas fibras colágenas da membrana basal, demonstrando anormalidades como descontinuidade ou mesmo desaparecimento da mesma, indicativos de capacidade de invasão e agressividade (BENAZZI et al., 1993), porém ainda são escassos os estudos envolvendo as fibras colágenas de tipo I e III.

Indiretamente, eventos relacionados ao tecido de sustentação representam etapas importantes para o desenvolvimento e progressão tumorais como a angiogênese e o remodelamento tecidual e fibrose (LU et al., 2011). Em destaque a neovascularização, que garante o suprimento de oxigênio e nutrientes, além de auxiliar na troca de resíduos do microambiente tumoral, assim, os níveis de fatores angiogênicos no tecido refletem a agressividade com que as células tumorais se espalham (NISHIDA et al., 2006). Dentre as fibras que compõe a MEC, o colágeno possui íntima relação com a angiogênese e ao remodelamento vascular (HANSEN et al., 2016).

Na maioria dos tumores malignos de mulheres, a tumorigênese, através da proliferação celular e invasão, estão indiretamente relacionadas à quantidade e a qualidade das fibras colágenas encontradas no tecido (NISHIDA et al., 2006). A célula tumoral valida sua capacidade de migração e invasão ao se aderir a fibra de colágeno tipo I, chegando aos tecidos adjacentes (MUSCHLER; STREULI, 2010). O forte tropismo das células

tumorais pelo colágeno tipo I, facilita o processo de metastização, já comprovado em linhagens celulares de carcinoma mamário (PANDEY et al., 2014).

Em mulheres, o reconhecimento direto ou indireto de mecanismos angiogênicos tem valor preditivo sobre o tratamento, além de definir o paciente como alto risco e conseqüentemente um prognóstico ruim quando a neovascularização está presente (NISHIDA et al., 2006).

Os dados relativos à presença ou ausência do colágeno não são suficientes para prever sobre interações moleculares com a MEC, o que dificulta a seleção das áreas de interesse (WEGNER et al., 2017). Assim, o uso associado destas técnicas laboratoriais de coloração pode permitir aos pesquisadores avaliações mais fidedignas das fibras colágenas, diferenciando as células pré-cancerígenas de células inflamatórias, demarcar os limites tumorais, ou ainda células em recombinação gênica (GADD, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar a relação entre a densidade estromal das fibras colágenas (tipo I e III) e a agressividade do carcinoma mamário de gatas, segundo distribuição periférica e central do tecido.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar a densidade do colágeno estromal através do método PSR com luz polarizada, tanto no tecido mamário saudável como nos diferentes tipos e graus histológicos dos carcinomas mamários das gatas.
- b) Utilizar análise digital de imagens para estimar a quantificação da densidade estromal mamário das gatas para validar a aplicação do método de coloração PSR.
- c) Indicar a predominância da forma madura de fibras colágenas de tipo I e III no estroma da mama saudável e compara-las os diferentes tipos e graus histológicos dos carcinomas mamários das gatas por meio do método imuno-histoquímico.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 80 amostras de tumores mamários de gatas (*Felis catus*) com ocorrência espontânea, provenientes do arquivo histopatológico do Serviço de Patologia Veterinária da Unimar – Marília - SP e do laboratório privado VetPat – Campinas – SP. Todas as pacientes passaram por mastectomia como conduta terapêutica. Pelo critério de exclusão, os adenomas (8) e displasias (7), assim como os tumores anaplásicos (10), carcinossarcomas (9) ou com extensas áreas necróticas (15) não foram incluídos. No total, foram utilizadas 31 amostras de carcinoma mamário primário de gatas diferentes, com idade mínima de 5 anos e máxima de 20 anos.

Para o grupo controle foram analisadas 4 amostras de parênquima mamário saudável, oriundas de gatas não histerectomizadas destinadas ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu para necropsia. Pela dificuldade em obter tecido mamário, pois em comparação a mulher e a cadela no anestro, a glândula mamária das gatas tem menor espessura, uma das gatas incluídas tinha menos de 40 dias de gestação, período em que a densidade mamária ainda é considerada compatível com a glândula normal (PAYAN-CARREIRA; MARTINS-BESSA, 2008). Foram excluídos os materiais em estado de degeneração, ou proveniente de gatas com afecção reprodutiva.

Todas as técnicas de processamento laboratorial utilizadas neste trabalho, descritas no decorrer deste subitem, seguiram o protocolo padronizado pelo Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu.

A partir das amostras em bloco de parafina, fixadas em solução de formalina a 10%, foram processadas em micrótomo com 3µm de espessura para obter os cortes histológicos que foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE).

Os carcinomas mamários das gatas foram classificadas segundo critérios adotados pela OMS (MISDORP et al., 1999) em três tipos mais prevalentes: Túbulo-papilífero - formações de túbulos e/ou projeções papilares;

sólido - arranjo das células tumorais em lençóis, cordões ou ninhos sólidos; e cribriforme - arranjo sólido, com pequenas aberturas, semelhante a uma peneira.

O grau considerou os critérios especificados nas Tabelas 2 e 3, utilizados para a graduação das neoplasias mamárias das mulheres (ELSTON; ELLIS, 1991), também conhecido por sistema de Nottingham (RAKHA et al., 2008), o qual também é indicado para classificação dos carcinomas mamários das gatas (CASSALI et al., 2018; DE CAMPOS et al., 2015).

TABELA 2. Graduação dos carcinomas mamários das gatas

Crítérios histológicos	Escore
Formação de túbulos	
Abrange a maior parte do tumor (>75%)	1
Moderado grau de acometimento (de 10 a 75%)	2
Pouco ou ausente (menor que 10%)	3
Pleomorfismo nuclear	
Núcleo pequeno, regular e uniforme	1
Aumento moderado de tamanho, vesiculação e variabilidade	2
Cromatina vesicular com acentuada variação de tamanho e forma	3
Contagem Mitótica	
0 – 8	1
9 – 16	2
≥ 17	3

Fonte: (ELSTON; ELLIS, 1991)

TABELA 3. Graduação final do Sistema de Nottingham

Pontuação final	Grau	Comentário
3-5	I	Bem diferenciado
6-7	II	Moderadamente diferenciado
8-9	III	Pouco diferenciado

Fonte: (ELSTON; ELLIS, 1991)

Para obter grupos homogêneos, as amostras de carcinoma mamário felinos também foram classificadas como de baixa (grau I e II) ou alta (grau III) graduação, divisão já adotada no estudo do carcinoma mamário de gatas (CASTAGNARO et al., 1998a, 1998b) e de mulheres em pesquisa com índice proliferativo (PETRIC et al., 2014).

4.1 Picrossirius Red

Pela técnica do Picrossirius Red estabelecida por Junqueira e colaboradores em 1979, os cortes foram distendidos em laminas histológicas comuns, mantidos uma hora em estufa a 56°C para desparafinização, e imersos em solução de ácido fosfomolibdico a 0,2% por dois minutos e lavagens sequenciais em água corrente e em água destilada. Logo após as laminas foram imersas em solução a 0,1% de Direct Red® (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO) dissolvido em ácido pícrico a 1,5% (aquoso saturado) por 110 minutos e submetidas a novo banho de imersão por dois minutos em solução de ácido clorídrico a 0,1 N. Por fim, o material foi lavado em solução de álcool a 70% por dois minutos e submetido aos processos de desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

O padrão de 5µm espessura ao micrótomo foi o utilizado para garantir a correta interpretação da birrefringência das fibras colágenas (CARRASCO et al., 1981; DAYAN et al., 1989).

4.2 Técnica Imuno-histoquímica

Após desparafinização e desidratação, os cortes foram submetidos a três banhos em água destilada por 5 minutos. Seguido pela recuperação antigênica utilizou-se o método enzimático para ambas as fibras colágenas. Durante este procedimento, as lâminas ficaram submersas em solução de pepsina a 2%, primeiramente por 10 minutos em estufa a 60°C, depois por 50 minutos em estufa a 37°C.

Resfriadas as lâminas, elas receberam três lavagens de cinco minutos em água destilada. Realizada a marcação com caneta hidrofóbica (Dako Pen®, S2002, Dako) para delimitar e garantir a correta distribuição e hidratação sobre o corte histopatológico.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram submetidos à incubação em solução de peróxido de hidrogênio, pronta para uso (Spring Bioscience®, cód.: DHP-125) por 20 minutos, lavados em solução tampão TRIS pH 7,4 e para bloqueio da proteína endógena, foi aplicada solução bloqueadora de proteína pronta para uso do kit EasyLink One® (EasyPath® -

EP-12-20504, anti-mouse – rabbit), durante 10 minutos. Isto feito os cortes foram lavados com água destilada.

A incubação dos cortes com os anticorpos primários (Tabela 4) foi realizada em câmara úmida numa bandeja com tampa, e lacrada com fita adesiva durante 18 horas a 4°C. Seguiram-se três lavagens de cinco minutos com a solução TRIS, aplicação do anticorpo secundário do kit EasyLink One® em temperatura ambiente (27°C) por 30 minutos. Para finalizar a técnica de marcação, as lâminas foram tratadas por 5 minutos em solução de 3,3' diaminobenzidina na concentração de 50 µl do cromógeno para cada um mL de diluente (K3466, Liquid DAB, DakoCytomationDenmark S/A®), para serem lavados em água destilada por 3 minutos. A contra coloração foi realizada utilizando-se Hematoxilina de Harris.

Por fim, os cortes foram imersos por 5 minutos em água destilada, depois mais cinco minutos em água corrente. Desidratados em soluções crescentes de álcool etílico, posteriormente xilol, e montadas com resina e lamínula.

O controle positivo e negativo foi realizado conforme indicação do fabricante dos anticorpos. Todas as amostras tumorais incluídas neste estudo apresentavam tecido mamário com pele e anexos, utilizado como controle interno positivo o estroma de sustentação e derme para as fibras colágenas.

TABELA 4. Anticorpos utilizados nos cortes de tecido de mama de gatas e suas especificações.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
Colágeno I	Policlonal	Novotec	1:2000
Colágeno III	Policlonal	Novotec	1:2000

4.3 Análise microscópica

Para avaliação da refração das fibras colágenas e validação o padrão e qualidade de coloração foram utilizados o microscópio de luz polarizada em campo escuro, modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmara digital modelo Axiocam MRc (Zeiss Vision, Alemanha) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia da UNESP. As imagens processadas pelo programa computacional de análise de imagem Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

A presença das fibras colágenas do estroma tumoral foi avaliada pelo método histoquímico de Picrossirius Red sob luz polarizada. Sua tipificação pela técnica de imuno-histoquímica, empregou o uso dos anticorpos anti-colágeno tipo I, anti-colágeno tipo III para resultados mais específicos.

A captura das imagens para ambas as técnicas de coloração laboratorial, respeitou a distribuição, sendo as imagens de periferia delimitadas abaixo da epiderme para o tecido normal, e pelas bordas do tecido neoplásico. A porção central, para o tecido saudável foi representada pelos campos adjacentes centralmente a periferia, e para os carcinomas, as porções intralobulares. Regiões de alta densidade estromal de derme, assim como as regiões ricas em artérias, não foram incluídas na análise digital de das imagens.

De cada corte histológico corado pelo PSR, foram fotografados cinco diferentes campos com objetiva de aumento de 20x para cada uma das regiões periférica e central, metodologia semelhante à adotada tanto para análise de tecidos conjuntivos (BAUMAN et al., 2014), como para tecidos neoplásicos prostático (CALDERÓN et al., 2019) e mamário (JEROME et al., 2018). Como realizado por estes autores as áreas que possuíam pele ou artérias não foram consideradas.

As imagens obtidas nos cortes corados pela IHQ em objetiva de 20x de aumento formam analisados de forma descritiva (MIOSGE et al., 2004) os anticorpos de cada tipo de colágeno I e III classificados de maneira semiquantitativa de acordo com a quantidade de fibras marcadas em escores como ausente (0), fraco (+), moderado (++) ou forte (+++) (BODE et al., 2000; KAUPPILA et al., 1999b) segundo a sua distribuição em cada uma das regiões periférica e central.

4.4 Análise quantitativa das imagens coradas pelo PSR.

Todas as imagens obtidas foram digitalmente processadas em um algoritmo desenvolvido em Matlab®, onde as imagens foram convertidas em tons de cinza em 8 bits, ou seja, com 256 níveis de cinza. A partir daí, foram extraídos atributos baseados no histograma da imagem, de estatística de primeira ordem, como média, desvio padrão, moda e mediana, além de skewness, curtose e entropia, que é baseado em matriz de correlação de pixels (HARALICK; SHANMUGAM; DINSTEIN, 1973). Estes atributos foram calculados conforme as equações a seguir.

A média de níveis de cinza representa a soma de todos os valores de intensidade de pixel da imagem dividido pelo número total de pixels que a compõe; utilizou a seguinte equação:

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_i.$$

O desvio padrão, uma medida de dispersão absoluta, mede de maneira mais precisa a distância média que os elementos possuem até a média aritmética. Confere maior confiabilidade que a variância, e respeitou a equação:

$$S_D \equiv \sigma_b = \left[\sum_{b=0}^{L-1} (b - \bar{b})^2 P(b) \right]^{1/2}$$

A moda é o valor de pico do histograma: corresponde ao valor de intensidade de pixel com maior frequência no histograma, representada pela equação:

$$O_F = N^2 + 2N^2 \log_2 N$$

A mediana é útil para supressão dos ruídos da imagem, valor central de um conjunto de valores ordenados, obtida pela equação:

$$\text{MED}\{K[f(j)]\} = K[\text{MED}\{f(j)\}]$$

Skewness é a mensuração estatística da simetria da distribuição, e utilizou a seguinte equação:

$$S_S = \frac{1}{\sigma_b^3} \sum_{b=0}^{L-1} (b - \bar{b})^3 P(b)$$

Kurtosis é a medida de cauda de distribuição de probabilidade, representa o grau de pico de uma distribuição, obtido pela equação:

$$S_K = \frac{1}{\sigma_b^4} \sum_{b=0}^{L-1} (b - \bar{b})^4 P(b) - 3$$

Entropia indica a quantidade de informação resultante das interações entre os pixels da imagem, segundo a equação:

$$S_E = - \sum_{b=0}^{L-1} P(b) \log_2\{P(b)\}$$

Extraídos os atributos, foi feita uma comparação entre os resultados do grupo controle.

4.5 Análise estatística

Em relação às fibras colágenas, independente do método de coloração aqui utilizado, à análise comparou a forma e a intensidade de distribuição na região periférica e central do tumor, segundo tipo e grau histopatológico.

A densidade estromal pelo Picrossirius Red, mensurada pelo valor médio da variáveis multiparametricas, *kurtosis* e entropia, dos cinco campos de cada região, foram submetidos a análise pelo software GraphPad 5 (GraphPad Software Inc®, La Jolla, CA) ANOVA com variância unidirecional, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, com valor de $p < 0,01$.

A avaliação qualitativa do tipo de colágeno predominante considerando a distribuição quanto à periferia e centro seguiu o mesmo padrão nos dois métodos laboratoriais.

Com a imuno-histoquímica, buscou-se a tipificação das fibras colágenas I e III, envolvidas no aumento da densidade estromal sinalizadas pelo PSR.

5 RESULTADOS

A distribuição dos tipos histológicos mostrou 14 casos (45,2%) de carcinoma sólido, 13 casos (41,9%) de carcinoma túbulo-papilífero, e quatro casos (12,9%) de carcinoma cribriforme. Com relação à graduação, sem se levar em conta o tipo histológico dos carcinomas obteve-se os seguintes resultados para os graus I, II e III, três (9,7%); 13 (41,9%) e 15 (48,4%) casos respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5. . Tipo e graduação histopatológica de carcinoma mamário em gatas.

Tipo	Grau I (n - %)	Grau II (n - %)	Grau III (n - %)	Total (n - %)
Túbulo-papilífero	3 – 23%	10 – 77%	0	13 – 41,9%
Sólido	0	2 – 14%	12 – 86%	14 – 45,2%
Cribriforme	0	1 – 25%	3 – 75%	4 – 12,9%
Total	3 – 9,7%	13 – 41,9%	15 – 48,4%	31 – 100%

Fonte: o autor.

Ao agrupar os carcinomas de acordo com sua diferenciação, os de baixo grau foram representados por 16 amostras (51,6%) de neoplasias mamárias de graus I e II, e os de alto grau com 15 amostras (48,4%) considerados os tumores de grau III. Esta classificação conferiu a distribuição amostral mais equilibrada dentre os resultados.

5.1 Atributos a partir do histograma da imagem binária

Os atributos escolhidos para a análise da densidade estromal no carcinoma mamário de gatas incluem dados univariados (média, mediana, moda e desvio padrão), como multivariados (*skewness* e *kurtosis*) para garantir a confiabilidade dos resultados. Foram extraídos a partir das imagens trabalhadas em 8 bits (Figura 1).

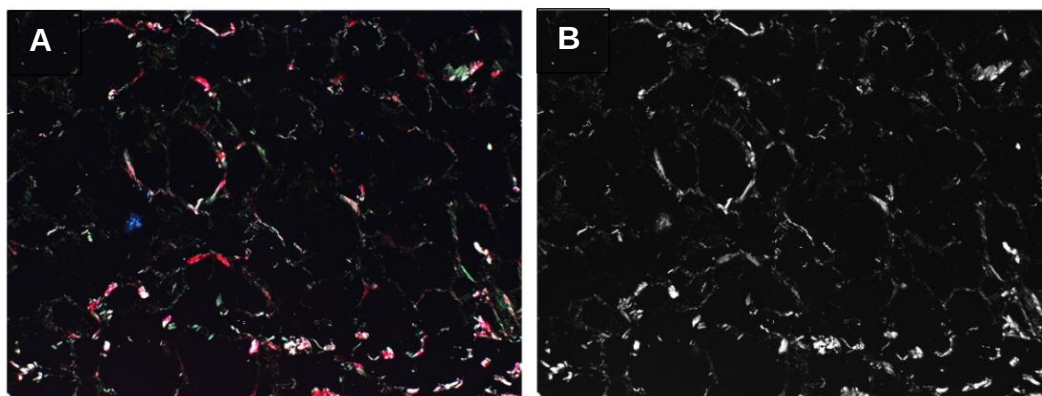


FIGURA 1. Amostra do grupo controle. Imagem capturada em campo escuro sob luz polarizada (A). A mesma imagem depois de transformada em 8 bits e retirado os ruídos de fundo (B).

No histograma o pico máximo da distribuição dos pixels representa o atributo moda. Quanto mais pontos claros (aqui representa as fibras colágenas), mais a curva se desloca à direita. Todos os valores de *kurtosis* obtidos formam positivos. O que pode ser observado na Figura 2.

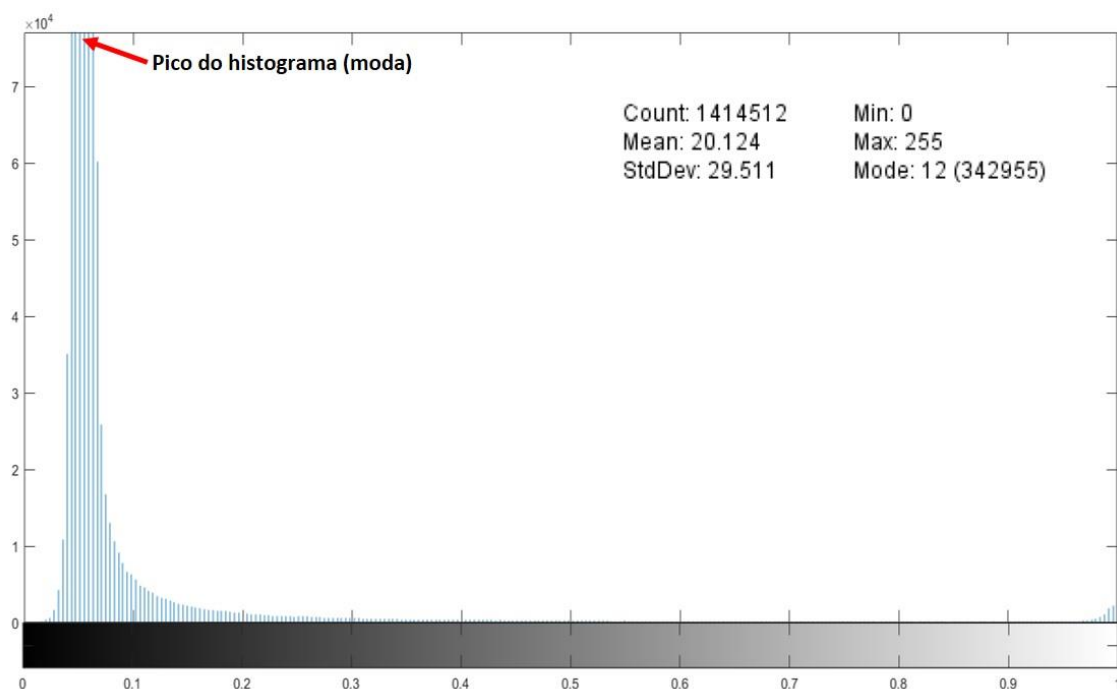


FIGURA 2. Histograma de uma das imagens do grupo controle utilizada para obter as informações calculadas.

O resultado numérico obtidos de cada um cindo campos analisados dos atributos extraídos do grupo controle podem ser observados nas Tabelas 6 e 7 separados segundo a distribuição.

TABELA 6. Valores de cada um dos atributos descritos para análise digital das imagens do grupo referência na região periférica do parênquima mamário saudável.

Periferia	Média	Moda	Desvio Padrão	Kurtosis	Skewness	Entropia
N1 1P	15,67591	6	23,61541	69,52329	7,49812	3,968895
N1 2P	11,43414	7	21,24814	81,63231	8,359103	3,605849
N1 3P	15,65573	10	24,60534	62,12622	7,350696	4,045816
N1 4P	8,239453	4	20,99621	79,48084	8,148152	3,054965
N1 5P	34,74058	33	23,75546	60,8527	7,129289	5,051035
N2 1P	17,68014	14	20,80549	73,34022	7,399077	5,219865
N2 2P	60,04276	56	25,15996	33,02757	4,664144	5,922482
N2 3P	26,01034	22	21,4215	66,79164	7,32895	4,912288
N2 4P	21,82263	16	21,36197	47,82772	5,850263	4,9638
N2 5P	20,92131	14	23,18949	45,3813	5,831915	4,911299
N3 1P	33,51035	25	26,8563	48,45068	6,35783	5,213293
N3 2P	10,81093	4	24,99123	58,92759	7,121666	3,696247
N3 3P	16,31274	9	26,4505	60,0718	7,318093	4,057246
N3 4P	33,51017	22	26,6541	48,4345	6,33451	5,213104
N3 5P	57,52901	55	23,95325	33,11125	4,353834	6,040664
N4 1P	13,64422	5	25,3047	50,81924	6,440168	4,224278
N4 2P	20,24826	10	30,44283	39,93179	5,829647	4,48707
N4 3P	17,68161	10	34,09205	28,31832	4,840799	4,517666
N4 4P	18,09378	5	37,20199	24,99998	4,562034	4,600357
N4 5P	17,09772	5	35,2012	26,20198	4,9562	4,500321
MÉDIA	23,53	16,60	25,87	39,84	6,38	4,64

Fonte: o autor.

TABELA 7. Valores de cada um dos atributos descritos para análise digital das imagens do grupo referência na região central do parênquima mamário saudável.

Cento	Média	Moda	Desvio Padrão	Kurtosis	Skewness	Entropia
N1 1C	54,09195	49	27,02582	18,90393	2,519926	6,501543
N1 2C	16,31124	13	21,07996	73,1026	7,689901	4,804016
N1 3C	58,78221	52	21,28158	45,71387	5,311318	5,778775
N1 4C	101,753	95	24,9912	9,153988	1,404333	6,546304
N1 5C	36,61423	30	24,35683	57,09798	6,80544	5,328384
N2 1C	20,1378	0	22,68999	40,27374	5,074321	5,608517
N2 2C	23,40145	19	22,82232	56,59056	6,724807	4,766514
N2 3C	36,18596	37	14,19583	108,0136	8,005334	5,139344
N2 4C	40,02733	42	18,13651	64,65615	6,375194	5,410615
N2 5C	40,60048	42	16,9782	76,41934	6,984792	5,294574
N3 1C	79,64479	63	28,46691	5,466271	1,171365	6,732022
N3 2C	38,40077	30	17,5203	12,09344	1,500834	5,596167
N3 3C	27,00537	20	28,50118	48,19199	6,381169	5,068196
N3 4C	12,29281	6	25,05086	65,88316	7,637156	3,554502
N3 5C	51,298	40	21,38716	36,85878	4,353212	5,784672
N4 1C	33,08899	29	20,97836	52,13271	5,763609	5,669749
N4 2C	36,94243	33	21,61864	41,29859	4,818552	5,883661
N4 3C	36,46877	30	20,81979	20,405	2,454773	5,655705
N4 4C	34,38174	12	22,23994	17,27679	2,186245	5,665423
N4 5C	38,38456	34	17,49015	31,41084	3,328837	5,602074
MÉDIA	40,79	33,80	21,88	67,95	4,82	5,52

Fonte: o autor.

A Figura 3 representa o valor médio obtido em cada um dos atributos extraídos no grupo controle segundo localização periférica ou central.

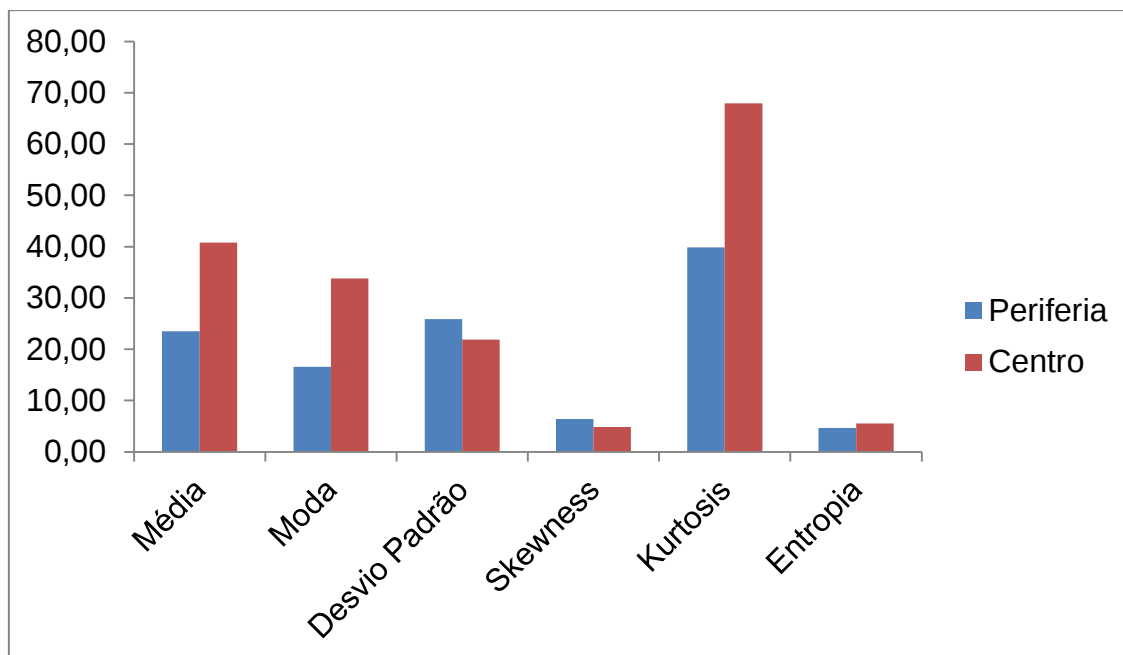


FIGURA 3. Valores médios para cada uma das variáveis do grupo controle segundo a distribuição. Referência para escolha dos atributos Kurtosis e Entropia como atributos de melhor confiabilidade estatística.

5.2 Picrossirius Red

A tabela 8 apresenta a média dos valores obtidos dos cinco campos analisados em cada uma das amostras de carcinoma mamário de gata, para *kurtosis* e entropia, segundo a distribuição. Os tipos e graus histopatológicos, assim como a idade de cada uma das gatas também estão descritos.

TABELA 8. Valor de kurtosis (Kurt) e entropia (Ent) de cada uma das amostras de carcinoma mamário de gata, segundo idade, tipo e grau histopatológico.

Número	Idade (anos)	Tipo histológico	Grau	Periferia Kurt / Ent		Centro Kurt / Ent	
1	5	Túbulo-papilífero	II	37,27	5,75	38,39	5,8
2	13	Túbulo-papilífero	II	28,05	5,21	26,92	5,45
3	10	Túbulo-papilífero	II	25,51	5,17	19,74	5,15
4	9	Túbulo-papilífero	II	26,01	5,03	20,20	5,7
5	14	Túbulo-papilífero	II	27,35	5,6	23,52	5,6
6	10	Túbulo-papilífero	II	29,38	4,68	21,86	5,99
7	13	Túbulo-papilífero	I	32,95	5,38	27,77	6,24
8	14	Túbulo-papilífero	I	26,79	5,21	34,68	5,62
9	10	Túbulo-papilífero	II	32,08	5,82	30,85	5,81
10	10	Túbulo-papilífero	II	28,60	5,01	27,79	5,55
11	15	Túbulo-papilífero	II	27,04	5,46	31,45	5,75
12	18	Túbulo-papilífero	II	32,13	5,6	26,22	5,96
13	6	Túbulo-papilífero	I	35,28	4,07	34,54	5,4
14	11	Sólido	II	27,27	5,18	24,33	5,58
15	10	Sólido	III	27,84	5,23	30,10	5,77
16	14	Sólido	III	33,36	5,36	32,14	5,86
17	14	Sólido	III	27,77	5,07	30,35	6,24
18	11	Sólido	III	20,02	5,65	41,12	5,96
19	13	Sólido	III	27,13	5,47	28,28	5,19
20	9	Sólido	III	39,47	4,69	18,91	6,24
21	20	Sólido	III	18,88	5,69	33,04	5,26
22	13	Sólido	II	33,05	5,22	28,28	5,54
23	9	Sólido	III	35,68	5,12	28,63	5,59
24	14	Sólido	III	41,18	5,37	18,14	5,8
25	14	Sólido	III	35,30	5,16	34,92	5,66
26	9	Sólido	III	29,08	5,62	27,24	5,9
27	16	Sólido	III	29,03	5,19	24,18	5,52
28	14	Cribriforme	II	37,31	5,31	29,22	5,82
29	14	Cribriforme	III	26,20	5,38	23,29	5,28
30	11	Cribriforme	III	33,12	5,47	22,02	5,71
31	14	Cribriforme	III	23,60	5,44	25,16	5,05

Fonte: o autor.

Os valores médios de *kurtosis* e entropia, foram agrupados pelos diferentes graus e tipos histopatológicos comparados com o grupo controle (Tabela 9).

TABELA 9. Valor médio de kurtosis (Kurt) e entropia (Ent) do tecido normal e dos carcinomas mamários de gatas, segundo tipo e graduação histopatológico em relação a região.

Amostra	Periferia		Centro	
	Kurt / Ent		Kurt / Ent	
Controle	39,84 ^a	4,62 ^a	67,95 ^a	5,53 ^a
Grau I	31,67 ^a	4,89 ^{ab}	32,33 ^a	5,75 ^a
Grau II	29,78 ^a	5,40 ^b	26,75 ^a	5,70 ^a
Grau III	30,12 ^a	5,30 ^b	27,90 ^a	5,64 ^a
Túbulo-papilífero	29,88 ^a	5,23 ^{ab}	27,99 ^a	5,69 ^a
Sólido	30,37 ^a	5,29 ^b	28,55 ^a	5,72 ^a
Cribriforme	30,06 ^a	5,40 ^{ab}	24,92 ^a	5,47 ^a

* Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as linhas da mesma coluna ($p < 0,01$).

**Fonte: O autor.

Ao analisar os valores obtidos de *kurtosis* perante os diferentes graus e tipos histopatológicos, não houve variação na densidade estromal na periferia e nem ao centro. Em relação a entropia não houve diferença estatística na região central, porém na periferia, houve aumento da densidade estromal nos carcinomas de graus II e III, assim como no tipo sólido, em relação ao controle, significativa quando $p < 0,01$ (Figura 4 e 5).

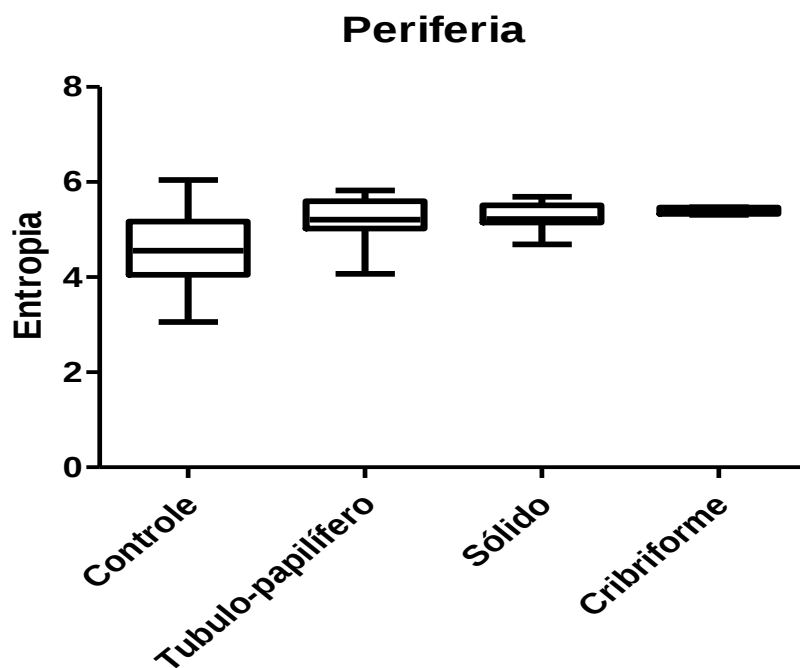


FIGURA 4. Segundo tipo histopatológico houve ganho de fibras colágenas na periferia dos carcinomas sólidos em relação ao tecido saudável ($p < 0,01$).

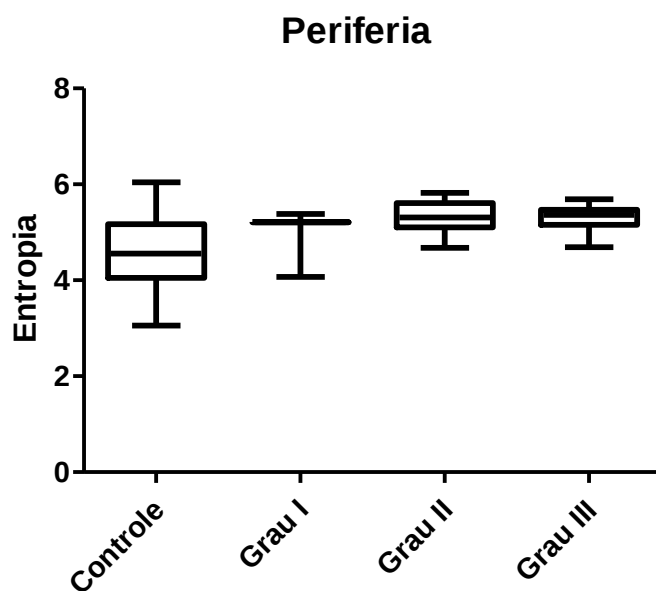


FIGURA 5. Segundo grau histopatológico houve aumento da densidade estromal na periferia nos carcinomas de moderada e pouca diferenciação em relação ao tecido saudável ($p < 0,01$).

A partir deste ponto, agrupadas as amostras de carcinoma mamário de gatas, segundo classificação de baixo e alto grau, como proposto na

metodologia. Os resultados de *kurtosis* e entropia, segundo a distribuição central ou periférica, foram obtidos os valores descritos na Tabela 10.

TABELA 10. Valor médio de *kurtosis* e entropia manifestado tanto pelo tecido saudável como pelos carcinomas agrupados segundo a baixa (grau I e II) e alta (grau III) graduação histopatológica.

Amostra	Periferia		Centro	
	Kurt / Ent		Kurt / Ent	
Controle	39,84 ^a	4,62 ^a	67,95 ^a	5,53 ^a
Baixo Grau	30,13 ^a	5,26 ^b	27,80 ^b	5,71 ^a
Alto Grau	30,12 ^a	5,30 ^b	27,90 ^b	5,64 ^a

*Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as linhas da mesma coluna ($p < 0,01$).

**Fonte: O autor.

Ao analisar em baixo e alto grau, houve diferença estatística para ambos os atributos ($p < 0,01$). Os grupos com carcinoma não diferem entre si, mas tanto os carcinomas de baixo como os de alto grau são estatisticamente significativos em relação ao tecido saudável. Ao analisar a região periférica como o atributo entropia, houve aumento da densidade estromal nos grupos com carcinoma (Figura 6), e com relação as imagens da região central, pelo atributo *kurtosis* também foi observado aumento na quantidade de fibras colágenas nos grupos de neoplasia maligna (Figura 7).

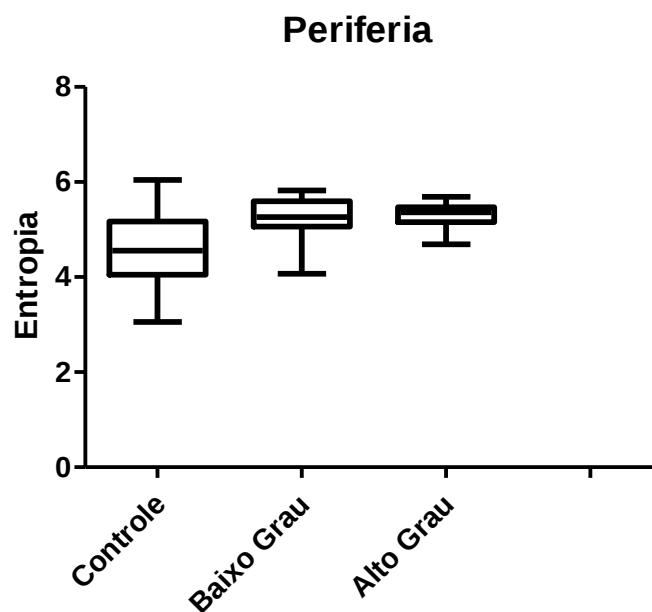


FIGURA 6. Valores médios de entropia obtidos em cada um dos grupos controle, carcinomas de baixo e de alto grau quanto a localização periférica. Valor de $p < 0,01$.

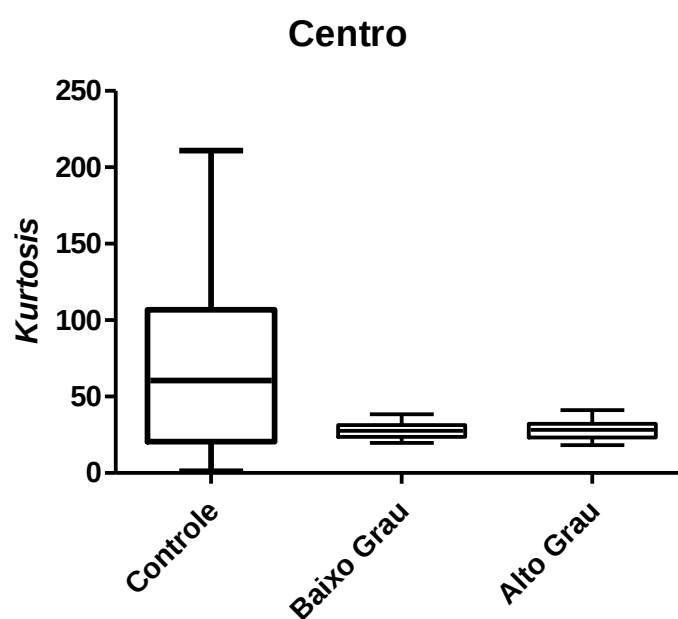


FIGURA 7. Valores médios de *kurtosis* em cada um dos grupos controle, carcinomas de baixo e de alto grau quanto a localização central. Valor de $p < 0,01$.

A análise descritiva está em ordem de prevalência, com seus resultados identificados a seguir, ilustrado na Figura 8 tanto o grupo controle como os carcinomas analisados no trabalho.

5.2.1 Controle

Todas as amostras controle tiveram padrão de forte marcação avermelhada por toda periferia. Espaços interlobulares bem delimitados por fibras avermelhadas, geralmente espessas. As delgadas por vezes com ausência de birrefringência, ou quando presentes são raras as fibras esverdeadas em porções centrais sobrepostas às espessas avermelhadas (Figura 8A).

5.2.2 Graduação

As amostras de grau I apresentaram prevalência de fibras esverdeadas tanto na periferia como ao centro (Figura 8B). Os carcinomas de grau II com prevalência de fibras avermelhadas na periferia e esverdeadas no centro (Figura 8C). Já as neoplasias de grau III, na periferia houve um equilíbrio de fibras avermelhadas e esverdeadas, com prevalência das esverdeadas no centro (Figura 8D).

5.2.3 Tipos histopatológicos

A semelhança do que foi apresentado pelos carcinomas mamários de grau II, houve prevalência de fibras avermelhadas na periferia e esverdeadas ao centro no tipo túbulo-papilífero. O tipo sólido com fibras avermelhadas e esverdeadas entremeadas de forma equilibrada na periferia, e esverdeada ao centro, padrão parecido ao grau III, enquanto o cribriforme manifestou fibras esverdeadas e avermelhadas entremeadas em equilíbrio de prevalência em ambas as regiões.

De forma geral houve aumento na quantidade das fibras colágenas de tipo III, a qual foi mais evidente na região central nos grupos tumorais, independente do grau ou tipo, com inversão da fibra de colágeno. A Tabela 11

mostra esta relação de predominância perante a apresentação de coloração das fibras, já interpretadas segundo refringência do tipo colágeno.

TABELA 11. Prevalência das fibras colágenas segundo análise por Picrossirius Red, classificadas quanto a graduação e tipos histopatológicos.

Amostra	Periferia	Centro
Controle	Col I	Col I
Grau I	Col III	Col III
Grau II	Col I	Col III
Grau III	Col I e Col III	Col III
Túbulo-papilífero	Col I	Col III
Sólido	Col I e Col III	Col III
Cribriforme	Col I e Col III	Col I e Col III

*Col I – Fibras colágenas de tipo I / Col III – fibras colágenas de tipos III

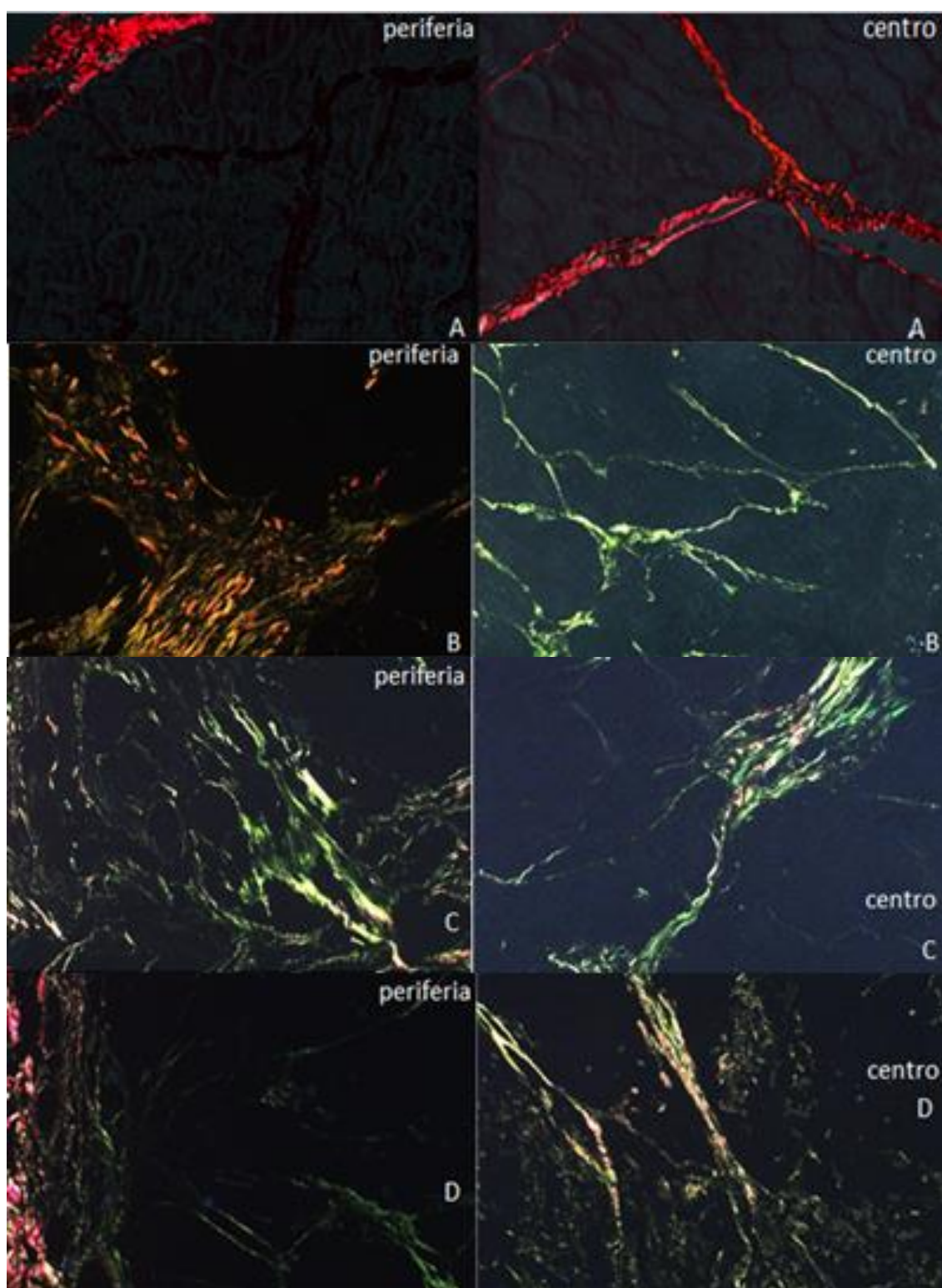


FIGURA 8. Carcinoma mamário em gatas, coloração Picrossirius Red.(A) Tecido normal; (B) túbulo-papilífero grau I; (C) sólido grau II; (D) cribriforme grau III. Adquiridas com lente de objetiva com 20x aumento.

5.3 Imuno-histoquímica

5.3.1 Colágeno I

Controle – variou de moderada a forte marcação no tecido de sustentação, assim como da derme (controle positivo). A região periférica foi bem delimitada, com moderado a forte padrão de marcação.

As porções centrais apresentaram forte marcação. Mesmo nas regiões de arranjo estromal mais delicado, a marcação esteve presente.

No parênquima mamário saudável, as fibras estavam presentes na periferia e sua proporção diminuiu à medida que o tecido de sustentação se remodela no sentido da região central. A principal característica de cada região esta ilustrado na Figura 9.

5.3.1.1 Graduação

Dentre os carcinomas mamários de gatas de grau I, duas amostras manifestaram forte marcação de periferia e uma com fraca marcação. Região central as três apresentaram moderada marcação. De forma geral, a marcação foi mais forte na periferia em relação ao centro (Figura 10).

Grau II – duas amostras com ausência de marcação na periferia e seis com fraca. Outras cinco mostraram moderada a forte marcação na região periférica tumoral.

Na região central quatro amostras com ausência de marcação central, três com fraca marcação, cinco com moderada e apenas duas com forte marcação.

Grau III – Na periferia três amostras com ausência de marcação, oito com fraca marcação, quatro com moderada marcação.

Na região central das neoplasias quatro amostras sem marcação, quatro fraca, e sete de moderada marcação.

Nenhum tumor classificado como GIII apresentou forte marcação seja na periferia ou na região central. O padrão se repetiu para os carcinomas pouco diferenciados (Figura 11).

5.3.1.2 Tipos histopatológicos

5.3.1.2.1 Túbulo-papilífero

Periferia – seis amostras com fraca marcação. Uma quase ausente. Duas de moderada e quatro com forte marcação.

Centro – três amostras ausência de marcação, três de fraca, cinco com moderada e duas de forte marcação.

Dentre as amostras túbulo-papilífero, uma de grau II, manifestou ausência de marcação na periferia e no centro. Somente duas amostras demonstraram maior marcação na região central em relação à periferia, uma de grau I e outra de grau II.

5.3.1.2.2 Sólido

Periferia – uma amostra com ausência de marcação. Nove com fraca marcação. Quatro com moderada marcação.

Centro – quatro amostras com ausência de marcação, nenhuma delas manifestou o mesmo na periferia. Três amostras com fraca marcação, sete com moderada marcação.

Dentre as amostras de tipo sólido, nenhuma manifestou forte marcação indiferente da distribuição. Seis amostras manifestaram maior marcação de centro em relação à periferia.

5.3.1.2.3 Cribriforme

Periferia – três amostras com ausência e uma com moderada marcação.

Centro – uma ausente, uma fraca e duas de moderada marcação.

Uma amostra apresentou ausência de marcação tanto de periferia quanto de região central. As outras duas com ausência de periferia também manifestaram inversão, com fraca e moderada marcação de centro. Como observado no grupo sólido, nenhuma amostra manifestou forte marcação seja de periferia ou de centro. A predominância de marcação das fibras colágenas tipo I pelo método imuno-histoquímico pode ser observada na Tabela 12.

TABELA 12. Predominância das fibras colágenas tipo I marcadas segundo a distribuição, de acordo com o grau e tipo histopatológico do carcinoma mamário felino (IHQ).

Amostra	Periferia	Centro
Controle	+++	++
Grau I	+++	++
Grau II	+	++
Grau III	+	++
Túbulo-papilífero	+	++
Sólido	+	++
Cribriforme	+	++

*Onde a quantidade de fibras marcação foi representada pelos sinais: 0 ausente; + fraca; ++ moderada; +++ forte.

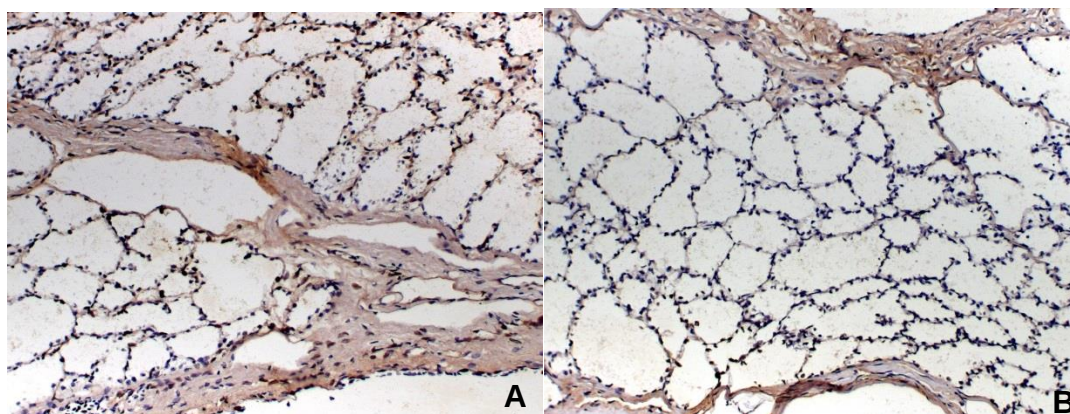


FIGURA 9. Marcação de fibras espessas no estroma de sustentação do tecido mamário normal de gata, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I, segundo distribuição periferia (A) e central (B). Objetiva com 20x aumento.

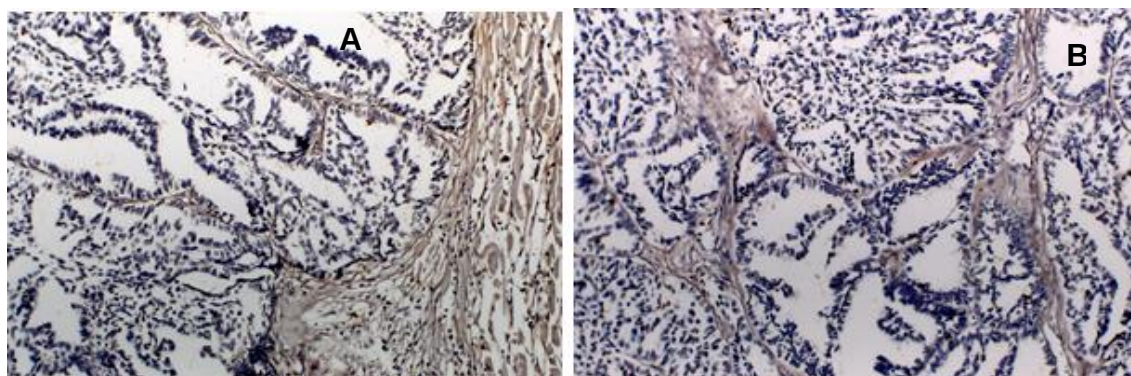


FIGURA 10. Carcinoma mamário em gata de baixo grau, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I. Grande quantidade de fibras marcadas na periferia (A), e fibras espessas bem marcadas ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.

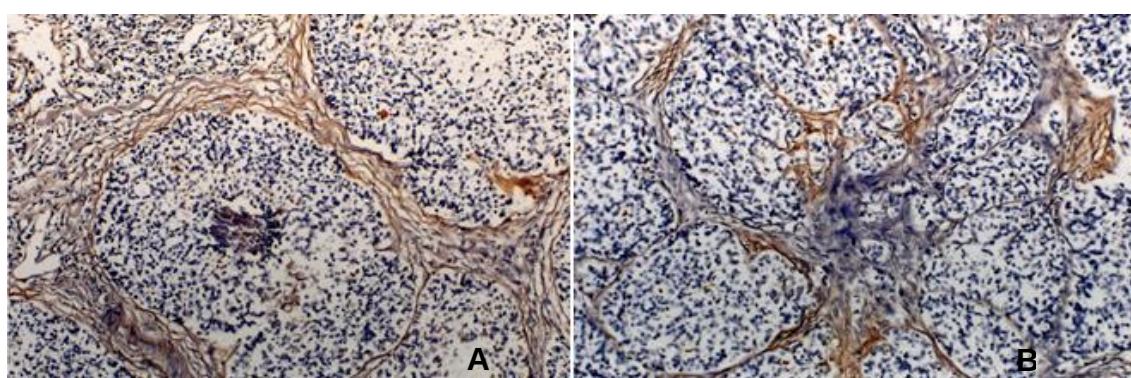


FIGURA 11. Carcinoma mamário em gata de alto grau, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo I. Ambas distribuições, periférica (A) e central (B) com estroma de sustentação bem delimitado pela coloração das fibras colágenas. Objetiva com 20x aumento.

5.3.2 Colágeno III

Controle – Forte marcação pelo parênquima de sustentação mamário, como na derme (controle positivo). Periferia com forte marcação predominante dentre as fibras mais delgadas.

Central com rara marcação, mas quando acontece são delicadas fibras observadas nas regiões de estroma mais espesso, mais evidentes quando próximas à periferia.

A semelhança do observado no colágeno tipo I, as fibras do tipo III a sua proporção diminui da periferia para o centro à medida que a densidade se altera. A Figura 12 ilustra o padrão observado no grupo controle.

5.3.2.1 Graduação

Grau I – na periferia cada uma das três amostras apresentou marcação de moderada a fraca.

Centro – todas as amostras com marcação moderada, presença discreta nos espaços interlobulares.

Grau II – predomínio de forte marcação na periferia do tecido neoplásico em áreas circunscritas. Uma amostra de carcinoma túbulo-papilífero apresenta descontinuidade das fibras. Um carcinoma sólido e um carcinoma cribriforme mostram marcação de fraca à moderada.

Na região central da neoplasia uma amostra de carcinoma sólido não mostrou marcação e uma amostra de carcinoma cribriforme apresentou raras fibras de forte marcação. Todas as demais, classificadas morfológicamente como carcinomas túbulo-papilíferos manifestaram marcação de moderada a forte, sendo mais evidente nos espaços interlobulares que nos intralobulares.

Grau III – Considerando-se as neoplasias desse grau na área periférica duas amostras mostraram forte marcação em áreas bem delimitadas. As demais neoplasias deste grupo variaram de fraca a forte marcação. Fraca e moderada quantidade nos carcinomas cribriformes, enquanto nos carcinomas sólidos há tanto fraca, moderada como forte marcação.

Na área central observou-se forte marcação em rara quantidade, sendo espaços interlobulares mais delimitados. Intermitente, hora boa marcação

interlobular e ausência de intralobular, hora o inverso. Em um carcinoma sólido não se observou marcação na periferia nem no centro.

5.3.2.2 Tipos histopatológicos

5.3.2.2.1 Túbulo-papilífero

Periferia - Uma amostra mostrou fraca marcação, três moderada (uma delas de grau II com descontinuidade), e nove com forte marcação (cinco destas circunscritas).

Centro – marcação variando de moderada a forte, evidente nas fibras mais delgadas. Chegou a ser intermitente mais evidente em regiões interlobulares e/ou intralobulares. Nos carcinomas de baixo grau (I e II) prevaleceu a ausência de marcação intralobular. Nas regiões centrais de alta densidade e a marcação foi mais evidente à medida que se aproxima da periferia.

5.3.2.2.2 Sólido

Periferia – oito amostras mostraram marcação variando de fraca a moderada. Três amostras apresentaram moderada quantidade de fibras marcadas e três amostras com grande quantidade de fibras.

Centro – nove amostras mostraram fraca marcação, e uma amostra de forte.

Uma amostra com ausência de marcação para colágeno III seja na periferia ou na região central (classificada como grau II), revelou estroma de alta densidade. De forma geral, região central tem alta densidade estromal com marcação positiva para colágeno III mais evidente à medida que se aproxima da região periférica da neoplasia.

5.3.2.2.3 Cribriforme

Periferia – a marcação positiva para colágeno tipo III varia de moderada a forte em uma amostra, enquanto três amostras apresentaram discreta quantidade. O único carcinoma cribriforme de grau II apresentou discreta marcação delimitando claramente o parênquima mamário.

Centro – uma amostra não apresentou marcação para colágeno do tipo III, uma com fraca e duas com forte marcação, que delimita os espaços interlobulares.

A marcação para o colágeno tipo III foi ausente, mesmo em áreas de alta densidade. Ao centro a predominância de marcação das fibras colágenas é a de tipo III.

A Tabela 13 esta embasada na predominância de marcação das fibras colágenas tipo III pelo método imuno-histoquímico.

TABELA 13. Predominância das fibras colágenas tipo III marcadas segundo a distribuição, de acordo com o grau e tipo histopatológico do carcinoma mamário felino (IHQ).

Amostra	Periferia	Centro
Controle	++	+
Grau I	++	++
Grau II	++	+++
Grau III	++	+++
Túbulo-papilífero	+++	++
Sólido	++	+
Cribriforme	+	+++

*Onde a quantidade de fibras marcação foi representada pelos sinais: 0 ausente; + fraca; ++ moderada; +++ forte.

As Figuras 13 e 14 ilustram o padrão de marcação predominante dos carcinomas de pobre e de melhor diferenciação respectivamente.

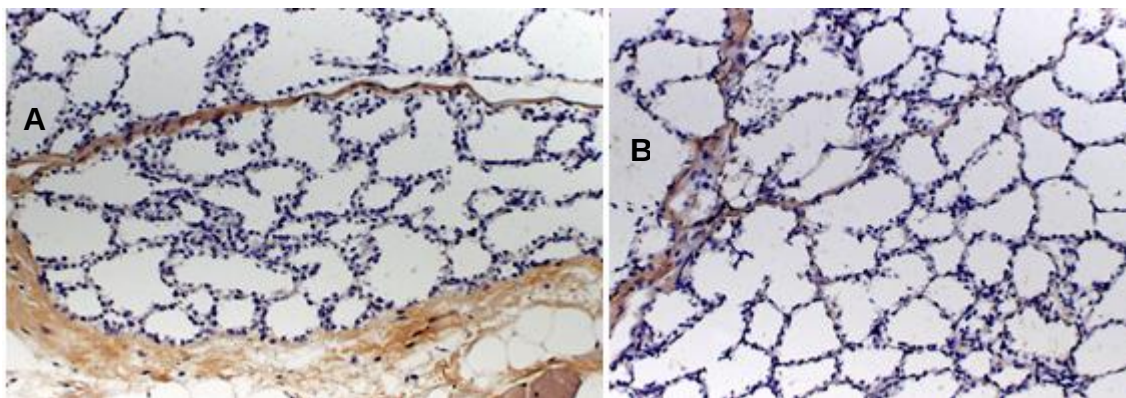


FIGURA 12. Tecido mamário normal de gata, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Marcação de fibras delicadas no estroma de sustentação. Moderada marcação na periferia (A), e fraca marcação ao centro (B). Objetiva com 20x

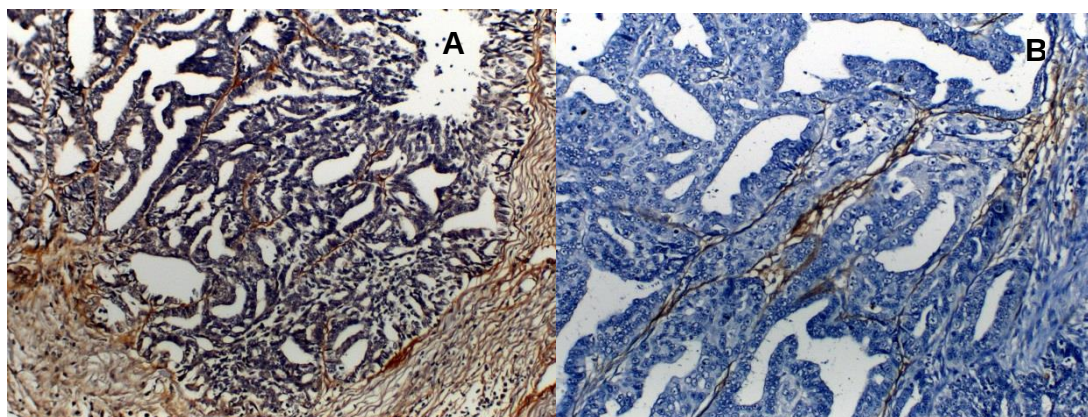


FIGURA 13. Carcinoma mamário em gata bem diferenciado, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Fibras estriadas circundam o foco tumoral com forte marcação na periferia (A). Moderada quantidade de fibras marcadas ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.

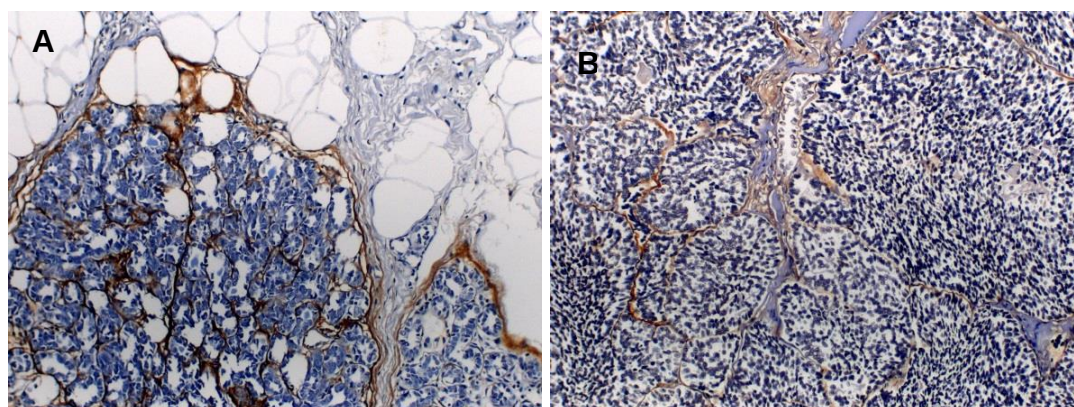


FIGURA 14. Carcinoma mamário em gata de pobre diferenciação, imuno-histoquímica anticorpo anti-colágeno tipo III. Moderada marcação de fibras na periferia (A), e forte marcação ao centro (B). Objetiva com 20x aumento.

6 DISCUSSÃO

Os tipos histopatológicos de carcinoma sólido foram os mais frequentes, seguidos muito de perto pelos carcinomas túbulo-papilíferos e os cribriformes com menos de 13% dos casos. Condiz com o observado por Seixas e colaboradores (2011) que traz o tipo sólido como de maior incidência. Quanto ao índice percentual, nosso resultado com cerca de 45% das amostras de carcinoma de tipo sólido, é similar com o relatado por outros autores, de 46,5% (SILVA et al., 2017) e 50% (DIAS PEREIRA; CARVALHEIRA; GÄRTNER, 2004).

O comportamento agressivo do tumor de mama em gatas fica claro ao constatar-se a alta incidência de neoplasias pouco diferenciadas, com valor ao redor de 5% para carcinomas de baixa graduação (SEIXAS et al., 2011). Menos de um décimo das amostras analisadas neste trabalho foram de baixo grau (grau I). As neoplasias mamárias de graus II e III predominaram apresentando percentuais de frequência muito próximos ao descrito, 47% e 48% respectivamente (SEIXAS et al., 2011).

As três amostras classificadas como de grau I, apresentavam características histopatológicas do tipo túbulo-papilífero, o que, pela histogênese concorda com a literatura, representa o grupo dos carcinomas bem diferenciados (GOLDSCHMIDT et al., 2011). As amostras de moderada diferenciação (grau II) foram observadas em todos os três tipos, porém mais de dois terços delas eram túbulo-papilífero. Já os carcinomas mamários de grau III manifestaram apenas nos tipos mais agressivos, sólido e cribriforme, a semelhança do descrito em gatas por outros autores (FILGUEIRA et al., 2015; SCHWEIGERT, 2011; SEIXAS et al., 2011). Nenhuma amostra túbulo-papilífero obteve grau III, o que corrobora com literatura (SPADER, 2009).

Embora haja uma nova proposta ao sistema de graduação das neoplasias mamárias de gatas (MILLS et al., 2015), a metodologia embasada na avaliação da glândula mamária da mulher (ELSTON; ELLIS, 1991) ainda é a que possui maior credibilidade no meio científico (DE CAMPOS et al., 2015; SEIXAS et al., 2011). Também foi a classificação indicada no último consenso brasileiro, com a proposta adaptada para mulheres, denominada Sistema de Nottingham (CASSALLI et al, 2018), utilizada nas amostras deste estudo.

A classificação histopatológica segundo graduação tem maior valor prognóstico em relação à tipificação no câncer de mama de diferentes espécies (MENDES et al., 2007; RAKHA et al., 2008; SEIXAS et al., 2011), que relaciona pior diferenciação ao comportamento agressivo (PETTERINO et al., 2007; SEIXAS et al., 2011).

Ao organizar as amostras em baixo (grau I e II) e alto (grau III) grau se obteve dois grupos de carcinoma mais homogêneos entre si do que quando classificadas em três grupos, o que confere maior força ao teste estatístico e consequentemente confiabilidade do resultado. Agrupamento semelhante ao utilizado na análise da proliferação celular em mulheres com câncer de mama (PETRIC et al., 2014).

Embora o aumento da densidade seja reconhecido como fator prognóstico, os componentes celulares envolvidos no aumento da densidade do parênquima mamário de mulheres ainda são discutidos, como pode ser observado na Tabela 1. O PSR poderia ser uma alternativa acessível para fornecer maiores dados sobre o estroma tumoral, para aprimorar o diagnóstico assim como já acontece para a coloração HE (CASSALI et al., 2018). Para isto novos estudos são necessários, e um dos desafios está no processamento da imagem.

As extensas áreas escuras de cada imagem garantiram a heterogenicidade dos dados univariados, com valores extremos de média, mediana e moda, e altos valores de desvio padrão, o que diminui a confiabilidade estatística destas informações. Assim atributos de dados multivariados como *skewness*, *kurtosis* e entropia ganham mais destaque como descritores de imagem (DOANE; SEWARD, 2011).

A refringência das fibras colágenas é característica graças a sua composição a base de carboidratos (MONTES et al., 1980) o que produz brilho nas imagens. Como o atributo *skewness* diminui os ruídos causados pelo brilho em imagens de fundo escuro (CAMBAZA; KOSEKI; KAWAMURA, 2018), sua utilização pareceu adequada. Ao aplicá-la no grupo controle, os resultados foram compatíveis com uma distribuição assimétrica positiva, padrão gráfico que diminui o desempenho das variáveis estatísticas média e mediana (DELMAS et al., 2007).

Poucos trabalhos utilizam a *kurtosis*, em parte devido à dificuldade em explicá-lo. Sua dispersão é caracterizada pela combinação das caudas do histograma em relação ao resto da distribuição (KIM, 2013). Quando próxima de zero indica uma distribuição normal ou mesocurtica, à medida que se torna positiva ou alta, a distribuição é dita leptocurtica e negativa ou plana para uma distribuição platicúrtica (WESTFALL, 2014). Nenhuma amostra obteve valor próximo de zero, com todos os resultados de *kurtosis* em distribuição positiva ou alta. Valores altos de *kurtosis* são preferidos para o bom desempenho estatístico (HUTLI; NEDELJKOVIC; BONYÁR, 2019).

Embora a interpretação da *skweness* seja complementar a *kurtosis* (DOANE; SEWARD, 2011), a baixa variabilidade de assimetria entre os valores médios de periferia e centro do grupo controle diminuiu sua confiabilidade estatística.

Mesmo sabendo que o valor de *kurtosis* depende do número de amostras (WESTFALL, 2014), as características de alto desvio padrão a distribuição plana no teste T (KOLLO, 2008), fortaleceram o uso deste descritor para quantificar as fibras colágenas no carcinoma mamário das gatas pelo método PSR. Além disto, a grande diferença apresentada entre periferia e centro do grupo controle tornaram este atributo adequado para analisar a densidade do colágeno. Outro fator importante para sua escolha, seus valores foram inversamente proporcional aos valores apresentados pela entropia, o que dá mais força estatística a *kurtosis*.

Nas imagens binárias em tons de cinza, analisadas neste trabalho, os pontos claros representam as fibras colágenas, macroscopicamente em menor quantidade em relação ao fundo escuro. Assim, ao se interpretar as imagens sobre luz polarizada pela técnica PSR do tecido mamário de gatas, o valor de *kurtosis* é inversamente proporcional a densidade estromal.

O atributo entropia pode ser definido como o número quantificador da randomicidade da imagem, ou seja, quanto maior seu valor, mais irregular, atípica ou despadronizada é a distribuição dos pixels (ROCKINGER; JONDEAU, 2002), o que para as imagens avaliadas neste trabalho, foi interpretado como desorganização das fibras, assim quanto menor seu valor, mais dispersas estão as fibras colágenas, e menor será sua densidade.

A extração de novos atributos de imagem que complementem a interpretação da densidade estromal é interessante, uma vez que o método histoquímico PSR se mostrou eficaz para avaliar as fibras colágenas. O uso desta técnica na rotina pode trazer dados importantes ao clínico a baixo custo (WEGNER et al., 2017).

Em mulheres, no tecido mamário normal, assim como em lesões benignas, ambos os tipos de colágeno fibrilar manifestam baixa atividade metabólica (KAUPPILA et al., 1999b), o que para gatas ainda não foi padronizado.

A completa diferenciação epitelial na mama da mulher se dá pela interação de sua MEC com os hormônios lactogênicos (LEE et al., 2009). *In vitro* foi observado que o controle desta diferenciação ocorre em ambientes ricos de colágeno fibrilar (tipo I e III), o que demonstrou a importância destas fibras como um dos múltiplos fatores de inibição (EDWARDS et al., 1998). A morfologia das células, assim como seu direcionamento, são dependentes da magnitude e dinâmica do gradiente químico, presentes tanto em processos fisiológicos quanto em processos neoplásicos (KAY et al., 2008). A formação de tais gradientes é regulada na maioria das vezes por fatores solúveis secretados longe do sítio de ação (KOJIMA et al., 2015).

Observado integridade do estroma, preservado em todas as amostras, o que corrobora com a literatura das mulheres, uma vez que às fibras colágenas tipo I e III exibem propriedades físicas de sustentação (THEOCHARIS et al., 2016), mas também atuam indiretamente na modulação da MEC (GRITSENKO; ILINA; FRIEDL, 2012).

De forma geral todas as amostras de mama de gata do grupo controle manifestaram homogeneidade no padrão de coloração por ambas as técnicas. Tanto o valor absoluto de *kurtosis* como de entropia do grupo controle manifestou maior densidade estromal na região de periferia do que ao centro.

Este padrão também é observado em mulheres, que atribui o aumento da densidade periférica em resposta a fibrose e a angiogênese à medida que se tornam malignas (MATSUBAYASHI et al., 2010). De forma geral, na periferia das neoplasias há maior densidade celular graças ao intenso recrutamento de diferentes linhagens celulares imunológicas (QUAIL; JOYCE, 2013). Em relação ao tecido mamário normal, o ganho de fibras colágenas

aconteceu na periferia dos carcinomas, o que pode indicar sua relação com a agressividade.

De maneira descritiva, foi observada grande quantidade de fibras colágenas de tipo I presentes em todo tecido de sustentação que circunda o parênquima mamário saudável das gatas. Nas porções centrais, os espaços interlobulares manifestaram boa delimitação, circunscritos por fibras colágenas do tipo I. Já as fibras colágenas de tipo III quando presentes se localizavam nas porções centrais geralmente sobrepostas as fibras de tipo I. A deposição expressiva do colágeno tipo I é apontada como precursor da tumorigênese em diferentes tipos de tecidos humanos (WANG et al., 2017).

O colágeno tipo I representa função estrutural importante para sustentação do parênquima mamário saudável da mulher (THEOCHARIS et al., 2016), o que também foi observado neste estudo para as gatas em ambas técnicas laboratoriais aplicadas. Pela imuno-histoquímica não houve diferença entre o tecido adjacente ao parênquima mamário e o centro como já foi relatado em mulheres, com intensa marcação da fibra de tipo I, observadas mesmo nas regiões afastadas do epitélio ou nas que circundam células epiteliais em involução (KAUPPILA et al., 1999b).

Em relação as fibras do tipo III, os resultados deste trabalho revelaram um padrão para o tecido mamário normal, com forte marcação na periferia e fraca ao centro, o que se assemelha ao citado para o parênquima mamário da mulher (KAUPPILA et al., 1999b), justificado por sua função estrutural como acontece para a fibra de tipo I (THEOCHARIS et al., 2016).

Mulheres com doença fibrótica nas mamas apresentam parênquima de maior densidade, o que predispõe ao câncer, pelo envolvimento das fibras colágenas no desenvolvimento e progressão tumoral (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

O desarranjo na arquitetura da MEC, induzida pela desregulação dos seus componentes representa um dos *hallmarks* do câncer (KOJIMA et al., 2015). No microambiente tumoral, a invasão celular ocorre ao longo das fibras de colágeno (LU; WEAVER; WERB, 2012) e no carcinoma mamário em mulheres, a mudança na densidade estromal é diretamente proporcional a capacidade de assimilar fatores de crescimento, o que favorece a progressão tumoral (OKOLICSANYI et al., 2014).

O valor prognóstico da densidade estromal depende do tipo de tecido estudado, nos tumores de mama é esperada a alta densidade estromal mesmo nas neoplasias benignas (KAUPPILA et al., 1999b). Tal aumento no componente estromal pode favorecer o desenvolvimento neoplásico no parênquima mamário (LU; WEAVER; WERB, 2012), e ainda, por vias indeterminadas, pode ser uma característica relacionada a forte potencial metastático (GARCÍA-MENDOZA et al., 2016).

Em estudo com mulheres, o aumento em pelo menos 50% na densidade do estroma mamário foi observado em 28% dos carcinomas analisados (BYRNE et al., 2001). Neste trabalho, mais de 80% das gatas manifestaram 50% ou mais de ganho de fibras colágenas na região central da neoplasia.

Outra via de interação das fibras colágenas estromais com as células neoplásicas é como orientador de mecanismos físicos para a invasão tumoral (KAUPPILA et al., 1999b; PEYROL et al., 1997). Nos estágios avançados, possuem ação também no sítio a distância, durante o processo de remodelamento para instalação da metástase óssea do tumor de mama (LIU et al., 2018). Nas neoplasias mamárias das gatas estes processos ainda não foram identificados.

Os tumores em mama das gatas possuem alta heterogenicidade tecidual como característica (SOARES et al., 2016a). Entre os critérios de classificação, a graduação é mais indicada como fator prognóstico, pois em relação aos tipos histopatológicos é mais fidedigno para estimar sobre o comportamento tumoral seja em mulheres (WIESE et al., 2013), em cadelas (MENDES et al., 2007), como em gatas (SEIXAS et al., 2011). Neste trabalho, o comparar os resultados não foi observada nenhuma diferença estatística quando agrupadas segundo tipo, mas tanto os valores de *kurtosis* como de entropia demonstraram o aumento da densidade estromal nos carcinomas em relação ao tecido saudável.

Ao analisar a *kurtosis*, tanto as amostras de baixo como as de alto grau, não apresentaram ganho da densidade estromal nem na periferia nem na região central. Mas ao comparar com o grupo controle houve o aumento da densidade significativo na região central, interpretada como ganho de fibras colágenas. Assim, pela análise de *kurtosis* é possível dizer que a semelhança

do observado na mulher (KAUPPILA et al., 1999b), ocorreu aumento na quantidade de fibras colágenas, que foi mais expressivo ao centro do tumor.

O uso do atributo entropia foi aplicado para avaliação de tumores prostáticos (JAFARI-KHOUSANI; SOLTANIAN-ZADEH, 2003), bem como de mama de mulheres, indicado por assumir características robustas aos resultados obtidos por processamento de imagens, traz o aprimoramento de detalhes dos limites periféricos da neoplasia, graças a seu coeficiente adaptativo dos tons de cinza (ZHANG; ZHANG, 2012). Assim a entropia foi importante para avaliar a periferia tumoral, demonstrando ganho de fibras colágenas em relação ao grupo controle em quantidade significativa tanto nos carcinomas sólido como nos de graduação II e III. Com este resultado é possível interpretar que, considerando as diferentes regiões da neoplasia, as fibras do centro tumoral se caracterizam em distribuição irregular e desorganizada, enquanto que na periferia há maior quantidade de fibras em padrão mais organizado e agrupado.

Ao comparar os resultados desta tese o grupo controle em relação aos carcinomas mamários de gatas houve o ganho na quantidade de fibras colágenas tanto na área central, identificado pela análise de *kurtosis*, como na periferia segundo a entropia, que foi significativo nos tumores pouco diferenciados (grau II e III, e tipo sólido).

No tecido mamário de mulheres a rigidez da MEC se dá pela modificação do estado de reticulação do colágeno (PASZEK et al., 2005), e confere fenótipo migratório invasivo às células neoplásicas mesmo em ambientes saturados de colágeno (CASSEREAU, 2015). Em linhagens celulares de carcinoma mamário, foram nas regiões de alta densidade de colágeno que as culturas manifestaram adesão focal (PASZEK et al., 2005). Tal comportamento invasivo, mesmo na ausência de fatores sistêmicos, indica que, com a interação de microambiente, seja esperado que o aumento de densidade, tanto do estroma como do epitélio mamário (PASZEK et al., 2005).

Assim, o microambiente estromal possui ação mecânica direta e inerente a estímulos externos, como indireta, onde a rigidez da MEC altera a secreção de citocinas pelas células tumorais e acaba por regular a resposta do sistema imunológico o que também representa papel crítico na progressão maligna. (CASSEREAU, 2015).

Como em mulheres o enrijecimento tecidual da mama se dá pela fibrose, pode explicar o aumento do risco de malignidade (COLPAERT et al., 2003), a alta densidade estromal, tanto de periferia como de centro, poderia auxiliar na compreensão da tendência ao comportamento agressivo das neoplasias mamárias das gatas (GUO et al., 2001; OZA; BOYD, 1993), uma vez que o excesso de colágeno fibrilar promove a invasão, enquanto a inibição da sinalização para a adesão reduz a adesão focal (PASZEK et al., 2005).

O aumento da densidade estromal na periferia tumoral está diretamente relacionada à agressividade de seu comportamento, impulsionado pelo seu aporte sanguíneo e de células de defesa (MATSUBAYASHI et al., 2000; MERCADO et al., 2004), o que também foi observado nas amostras de carcinoma mamário de gatas deste trabalho. Ao centro, tal fenômeno também pode estar ativo, pois houve ganho de fibras colágenas. Em outra hipótese, a densidade estromal aumenta devido a função estrutural (THEOCHARIS et al., 2016), e molecular (LIU et al., 2018) destas fibras que se moldam de acordo com a necessidade do tecido glandular.

Estes resultados sugerem que assim como o aumento da densidade do estroma mamário representa um fator de risco à mulher (THURFJELL, 2002) também ocorra nas gatas.

Ao analisar de forma descritiva as amostras coradas pelo PSR, as fibras de refração avermelhada, ou seja, o colágeno de tipo I (CARRASCO et al., 1981) foram as prevalentes no grupo controle em ambas as regiões.

Pode-se dizer que, na periferia tumoral houve variação, sendo o tipo túbulo-papilífero o mais semelhante ao controle, demonstrando sua boa diferenciação (DE CAMPOS et al., 2015). Mas ao centro, foi notória a mudança de prevalência de colágeno I no tecido saudável para o tipo III em todos os tipos e graduações dos carcinomas. Em mulheres, tal proporção de aumento de deposição de colágeno foi citada, diferenciando tumores benignos de malignos na mama (KAUPPILA et al., 1999b).

Dos tipos histopatológicos, 60% das amostras de tipo sólido tiveram fraca marcação de fibras de tipo I uma delas inclusive ausente, enquanto nos cribriformes, a maioria foi ausente. Estroma tumoral desorganizado danifica o mecanismo de interligação estrutural, padrão observado em mulheres

portadoras de tumores mamários altamente malignos, (KAUPPILA et al., 1999b).

Embora se espere que o grupo de melhor diferenciação, grau I, tenha maior similaridade com o tecido de origem (HUGHES; DOBSON, 2012), apresentou prevalência de fibras de tipo III em ambas as regiões, enquanto no grupo controle, também para ambas as regiões, mas as fibras de tipo I. Isto pode sugerir que as fibras de tipo III também estejam envolvidas na carcinogênese.

As amostras de moderada (II) e alta (III) graduação manifestaram diminuição de fibras colágenas de tipo I na periferia e aumento do tipo III na região central. A prevalência que mais chama atenção foi em relação ao colágeno tipo III na porção central. Dado que chama a atenção, uma vez que são nos ambientes mamários densos, ricos em colágeno tipo I, que ocorre à ativação do compartimento estromal e atribui a capacidade de progressão e invasão tumoral (PROVENZANO et al., 2008), e não do tipo III, como concluído nos resultados deste trabalho.

Em relação ao colágeno I, mais de 45% das amostras classificadas como tipo histopatológico túbulo-papilífero, a marcação foi fraca na periferia tumoral. Ou seja, no grupo de neoplasias bem diferenciadas (BETZ et al., 2012), a semelhança do observado quanto a graduação, quase metade das amostras apresentaram arranjo muito diferente do esperado pelo tecido controle. Esta heterogenicidade pode ser explicada pelo comportamento complexo da MEC com semelhanças quanto à morfologia, mas não a função (LIPTON et al., 2018).

Embora o colágeno de tipo I seja considerado uma barreira estrutural contra a invasão tumoral, contrariamente o aumento da quantidade de colágeno, esta associado à alta incidência de metástases (RAMASWAMY et al., 2003). Ao considerar que a fibrose tecidual aumenta o risco de malignidade (COLPAERT et al., 2003), como fator de risco, o ganho de fibras colágenas de tipo I é diretamente proporcional a chance de desenvolvimento câncer de mama (BOYD et al., 2002).

O movimento migratório das células neoplásicas através dos feixes de colágeno (CONDEELIS; SEGALL, 2003), no carcinoma mamário em mulheres é orientado pelas fibras de tipo I (CONDEELIS; SEGALL, 2003; GRITSENKO;

ILINA; FRIEDL, 2012). A proporção de colágeno I foi mantida no centro e apenas nas neoplasias de grau I na periferia, o que contradiz o esperado, pois não foi observado maior quantidade destas fibras nos tumores mais indiferenciados.

De forma geral, tanto a periferia como o centro tumoral no carcinoma mamário da gata, a fibra que se mostrou mais presente foi a de tipo III. Sua função estrutural (LIPTON et al., 2018; THEOCHARIS et al., 2016) pode ser observada ao comparar as amostras de grau II e III ao grupo controle, demonstrando inversão na proporção esperada de colágeno na região central, com predominância de fibras tipo III.

A boa diferenciação das fibras colágenas é observada no tecido saudável, assim como no benigno. O aumento na deposição de formas imaturas do colágeno (STERNLICHT, 2005) poderia interferir na função do tecido reticular. Como a IHQ identifica as fibras colágenas maduras, é possível que pela presença de fibras imaturas em cada um dos tipos nas amostras tumorais, pouca quantidade de colágeno tipo I na periferia tenha sido identificada, ou ainda que o efeito regulatório das células epiteliais adjacentes do parênquima mamário sobre o estroma tumoral estava preservado (KAUPPILA et al., 1999b), mesmo nos tipos de carcinoma mais agressivos.

Outro fator importante, o aumento na deposição da forma imatura da fibra tipo I, por si só, é considerado fator prognóstico para a mulher (BOYD et al., 2001; PROVENZANO et al., 2008), e que a baixa concentração de colágeno tipo I maduro na mama da mulher tem caráter de progressão tumoral nos casos de carcinoma, por representar fator quimiotático para macrófagos (OSKARSSON, 2013). Ou seja, os resultados obtidos no carcinoma mamário das gatas podem sugerir que, o envolvimento da fibra colágena tipo I tenha relação com a progressão tumoral como acontece nas mulheres, principalmente na região periférica, onde as amostras perdem a fibra de tipo I a medida que se tornam mais agressivas.

Em relação ao colágeno de tipo III, a região de maior diferença foi a central. O aumento das fibras deste tipo de colágeno no tecido maligno em relação ao normal foi observado na mama de mulheres (KAUPPILA et al., 1999b). Dentre os túbulo-papilíferos, mais de 60% mostrou um padrão forte de marcação positiva para colágeno III. Percentual parecido foi obtido perante

graduação I que, inversamente, manifestou pouca quantidade de fibras marcadas na periferia.

Embora o arcabouço de sustentação dos adipócitos que compõe o parênquima mamário dependa da conexão das fibras colágenas do tipo III às de tipo I (SBARBATI et al., 2010), a diferença na concentração entre estas duas fibras colágenas está relacionado com o desequilíbrio do remodelamento da MEC, que fica intenso nas neoplasias mais indiferenciadas (GOPINATHAN et al., 2015).

Um único sólido grau III foi negativo para o colágeno III, tanto na periferia como na porção central, com controle interno positivo. Isto poderia ser justificado pelas formas imaturas de colágeno, como pela atuação em desequilíbrio de vias de degradação das metaloproteinases (VIZOSO et al., 2007), o que contribui à tumorigenese.

Como o processo que gera a metástase é multifatorial, sugere-se o estudo associado das vias moleculares para correta interpretação da dinâmica estromal, e assim a fortalecer como ferramenta prognóstica (VIZOSO et al., 2007).

Importante ressaltar que neste trabalho, áreas naturalmente ricas em fibras colágenas não foram consideradas durante a análise da imagem, como a literatura recomenda (RICH; WHITTAKER, 2005).

O uso associado das técnicas histoquímica à imuno-histoquímica, como já relatado, foi eficaz para delimitar as regiões de interesse (PSR), para posterior tipificação das fibras colágenas pela IHQ, o que permitiu avaliar a estrutura e estimar sobre as interações celulares entre o microambiente tumoral e estromal adjacente (WEGNER et al., 2017). O que reforça a importância de novos estudos sobre a perspectiva de mecanismos moleculares.

Entre outros critérios, a idade representa um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres (WINTERS et al., 2017), esperado uma relação inversamente proporcional da densidade estromal da mama com a idade, ou seja, quanto menor a idade maior é a densidade (LOKATE et al., 2013).

A idade de maior risco é na faixa dos 60 anos, naquelas mulheres onde a densidade do parênquima mamário não diminui como seria esperado pela

influencia da menopausa (UNLU et al., 2017). De forma geral, os tecidos envelhecidos tendem a ser mais rígidos por conter altos níveis de ligações cruzadas entre fibras aberrantes de colágeno, o que aumenta drasticamente a incidência tumoral (SZAUTER et al., 2005).

As idade mínima e máxima de gatas com o carcinoma mamário foi de 5 e 20 anos respectivamente, com a faixa etária média de 12 anos, próximo ao citado por outros autores, entre 10 e 11 anos (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; ZAPPULLI et al., 2005).

As gatas mais jovens tendem a apresentar a neoplasia mamária bem diferenciada (TOGNI et al., 2013). Dentre as amostras utilizadas neste trabalho, uma das gatas tinha cinco e outra seis anos, ambas com carcinomas tubulopapilíferos de baixa graduação. Embora o parenquima mamário mais denso nas mulheres jovens possa contribuir para agressividade (CHECKA et al., 2012), isto não ocorreu com as amostras de gatas aqui incluídas. Os tipos mais agressivos de câncer de mama ocorrem nas jovens (< 35 anos) e nas premenopausa (UNLU et al., 2017).

Como descrito em literatura, a maioria das amostras de alta graduação (< 70%) apresentou idade superior a 12 anos (SEIXAS et al., 2011). Dados semelhante pode ser extrapolado em relação as mulheres, pois após 65 anos ou pós-menopausa representa a faixa etária de maior risco de desenvolver o câncer de mama (UNLU et al., 2017). Dentre os tumores de alta graduação, a gata mais jovem apresentou nove anos.

Quanto à densidade estromal, na periferia, a maior densidade foi na gata mais velha (20 anos), enquanto a menor densidade, próxima do valor do grupo controle foi numa gata de 14 anos, ambas com tumores sólidos grau III.

Já na região central, a gata com maior densidade, tinha 14 anos de idade, e a de menor densidade foi uma gata de 11 anos, a semelhança do observado na região periférica, aqui ao centro, ambas manifestaram carcinoma de tipo sólido grau III.

Embora as interações hormonais na mulher, sejam representativas principalmente durante a menopausa (RUTTER et al., 2001), em gatas não é tão significativa (PIPERIGKOU et al., 2016), uma vez que o carcinoma mamário pode acometer espontaneamente mesmo as felinas submetidas à esterilização,

o que dificulta os critérios de interpretação (MULAS et al., 2002; OVERLEY et al., 2005).

Mesmo em mulheres, a alta densidade do parênquima mamário, pode ser considerada por si só um fator de risco ao câncer de mama independente da idade ou etnia (MCCORMACK; SILVA, 2006).

Embora haja estudos epidemiológicos que incluem a faixa etária das gatas acometidas pelo carcinoma mamário (MORRIS, 2013; SEIXAS et al., 2011; TOGNI et al., 2013; ZAPPULLI et al., 2005), não há citação que relacione a densidade das mamas com a idade das gatas. Na medicina humana, os avanços das técnicas diagnósticas, se aperfeiçoam cada vez mais e fim de aprimorar a detecção precoce da doença nas mulheres, com exames de rastreamento a partir dos 35 anos (BURNSIDE et al., 2019).

Além do controle genético-epigenético, outras vias regulatórias e fatores de transcrição estão envolvidos na tumorigênese (MASAAKI et al., 2010). No carcinoma a progressão tumoral são induzidos pela secreção de fatores de crescimento e citocinas (ALBERGARIA et al., 2011; WEIGELT; PETERSE; VAN'T VEER, 2005). Em seguida a MEC se repolariza, levando ao remodelamento das fibras de actina do citoesqueleto o que garante a ação degradadora das MMPs (MASAAKI et al., 2010), rompendo as membranas biológicas.

O aumento na densidade estromal, também se deve aos fibroblastos associados ao câncer, estimulados direta ou indiretamente (estímulo quimiotático) pelas próprias células neoplásicas (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; WANG et al., 2017).

Como foi observado neste estudo, o aumento da densidade estromal na região central acontece pelas fibras de colágeno tipo III. A baixa resposta às terapias instituídas as gatas com carcinoma mamário (CASSALI et al., 2018; DE CAMPOS et al., 2015) pode sugerir que características estruturais, como estas, possam estar envolvidas neste processo. Em mulheres se sabe que a alta concentração de células mesenquimais associadas às neoplásicas realça a capacidade invasora (PANG et al., 2013). Também constitui uma barreira física, responsável por encapsular a neoplasia (MASAAKI et al., 2010), característica desfavorável às terapias instituídas, garantindo a tendência tanto

a quimio como a radio resistência, assim como a terapias moleculares (MASAAKI et al., 2010; PANG et al., 2013).

O câncer de mama em mulheres apresenta certos entraves na pesquisa quanto diagnóstico e terapeutica por falta de um modelo animal (PANG et al., 2013), o que reforça a importância de trabalhos como este com a espécie felina.

7 CONCLUSÃO

A técnica de Picrossirius Red permitiu avaliar a distribuição das fibras de colágeno e estimar a densidade estromal do parênquima mamário das gatas. A imuno-histoquímica demonstrou, tanto o arranjo como a identificação específica das formas maduras dos colágenos de tipo I e III, constituintes do estroma mamário, demonstrando ação complementar entre as duas técnicas de coloração.

Dentre os atributos extraídos das imagens do tecido saudável, das propriedades de luminescência, foi a *kurtosis* que mostrou maior confiabilidade estatística para estimar a densidade estromal, principalmente da região central. Já, das propriedades de textura, a entropia foi o atributo mais fidedigno para analisar a periferia da glândula mamária de gatas, coradas pelo método PSR.

A densidade estromal da mama da gata aumenta no carcinoma tanto na periferia como no centro, tendo relação com a agressividade tumoral.

A perda da forma madura de colágeno tipo I na periferia se evidencia à medida que o carcinoma fica mais agressivo, e foi perceptível mesmo nos grupos com carcinoma bem diferenciado.

Há aumento da densidade na região central dos carcinomas mamários de gatas, assim como ganho de fibras colágenas de tipo III maduras, o que pode indicar seu envolvimento na carcinogênese deste tipo tumoral.

REFERÊNCIAS

AGIOSTRATIDOU, G. et al. Differential cadherin expression: Potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 12, n. 2–3, p. 127–133, 2007.

ALBERGARIA, A. et al. P-cadherin role in normal breast development and cancer. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 7-8–9, p. 811–822, 2011.

ALLOWAMI, S. et al. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. R129, 2003.

AMORIM, F. V. et al. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 6, p. 379–388, 2006.

ARESU, L. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 33, 2011.

AUGSBURGER, H. R.; HENZI, D. Immunohistochemical expression of collagen types I, III, IV and α -actin in the uterine horns of nulliparous and multiparous beagles. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1070–1076, 2008.

BAUMAN, T. M. et al. Characterization of Fibrillar Collagens and Extracellular Matrix of Glandular Benign Prostatic Hyperplasia Nodules. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109102, 2 out. 2014.

BEHA, G. et al. ScienceDirect Molecular Phenotype of Primary Mammary Tumours and Distant Metastases in Female Dogs and Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 2–3, p. 194–197, 2014.

BENAZZI, C. et al. Basement membrane components in mammary tumours of the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 109, p. 241–252, 1993.

BETZ, D. et al. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.**, v. 40, n. 4, p. 235–42, 2012.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. November, p. 332–337, 2004.

BODE, M. K. et al. Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: Evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 32, n. 6, p. 1201–1207, 2000.

BOYD, N. F. et al. Mammographic densities and the prevalence and incidence

of histological types of benign breast disease. Reference Pathologists of the Canadian National Breast Screening Study. **Eur J Cancer Prev**, v. 9, 2000.

BOYD, N. F. et al. Mammographic densities as a marker of human breast cancer risk and their use in chemoprevention. **Curr Oncol Rep**, v. 3, 2001.

BOYD, N. F. et al. The association of breast mitogens with mammographic densities. **Br J Cancer**, v. 87, 2002.

BRIGHT, R. A. et al. Relationship between mammographic and histologic features of breast tissue in women with benign biopsies. **Cancer**, v. 61, 1988.

BRINCKERHOFF, C. E.; RUTTER, J. L.; BENBOW, U. Interstitial Collagenases as Markers of Tumor Progression. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4823 LP – 4830, 1 dez. 2000.

BRISSON, B. K. et al. Type III Collagen Directs Stromal Organization and Limits Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 5, p. 1471–1486, maio 2015.

BROWN, J. D. Reliability of surveys. **Shiken: JALT Testing & Evaluation SIG**, v. 1, n. September, p. 18–21, 1997.

BRUNETTI, B. et al. Molecular Phenotype in Mammary Tumours of Queens: Correlation between Primary Tumour and Lymph Node Metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148, n. 2–3, p. 206–213, 2013.

BURNSIDE, E. S. et al. Age-based versus Risk-based Mammography Screening in Women 40–49 Years Old: A Cross-sectional Study. **Radiology**, p. 181651, 11 jun. 2019.

BYRNE, C. et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, 1995.

BYRNE, C. et al. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**, v. 12, 2001.

C.S., M. et al. CXCR4 and its ligand CXCL12 display opposite expression profiles in feline mammary metastatic disease, with the exception of HER2-overexpressing tumors. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 2018.

CALDERÓN, L. G. R. et al. Characterization of Collagen Fibers (I, III, IV) and Elastin of Normal and Neoplastic Canine Prostatic Tissues. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 1, p. 22, 2 mar. 2019.

CALIARI, D. et al. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2014.

CAMBAZA, E.; KOSEKI, S.; KAWAMURA, S. The Use of Colors as an Alternative to Size in *Fusarium graminearum* Growth Studies. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 7, p. 100, 27 jun. 2018.

CANNON, C. M. Cats, Cancer and Comparative Oncology. p. 111–126, 2015.

CARRASCO, F. et al. Comparative Morphologic and Histochemical Studies on the Collagen of Vertebrate Arteries '. v. 302, p. 296–302, 1981.

CASE, A. et al. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180448–e0180448, 6 jul. 2017.

CASSALI, G. et al. **Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors**. [s.l: s.n.]. v. 55

CASSEREAU, L. D. Tissue Stiffness Drives Breast Cancer Malignant Progression. In: **UCSF**. [s.l.] <https://escholarship.org/uc/item/0kc900n3>, 2015. v. 111p. 1009–1010.

CASTAGNARO, M. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 65, n. 3, p. 223–226, 1998a.

CASTAGNARO, M. et al. Tumour Grading and the One-year Post-surgical Prognosis in Feline Mammary Carcinomas. v. 119, p. 263–275, 1998b.

CHECKA, C. M. et al. The Relationship of Mammographic Density and Age: Implications for Breast Cancer Screening. **American Journal of Roentgenology**, n. March, p. 292–295, 2012.

CHOUAIB, S. et al. Hypoxia Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 21, 2012.

COLPAERT, C. G. et al. The Presence of a Fibrotic Focus in Invasive Breast Carcinoma Correlates with the Expression of Carbonic Anhydrase IX and is a Marker of Hypoxia and Poor Prognosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 81, n. 2, p. 137–147, 2003.

CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 12, p. 921–930, 2003.

CONSULTING, B. P. I. 1 © 2016 BPI Consulting, LLC www.spcforexcel.com. n. February, p. 1–12, 2016.

DAYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93, n. 1, p. 27–29, 1989.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 2007.

DE CAMPOS, C. B. et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003–1012, 2015.

- DE LAS MULAS, J. M. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay☆. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 111–125, 2000.
- DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 429–447, 2003.
- DELMAS, R. et al. Assessing Students' Conceptual Understanding after a First Course in Statistics. **Statistics Education Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 28–58, 2007.
- DIAS PEREIRA, P.; CARVALHEIRA, J.; GÄRTNER, F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue - An immunohistochemical study. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 2, p. 180–185, 2004.
- DOANE, D. P.; SEWARD, L. E. Measuring Skewness: A Forgotten Statistic? **Journal of Statistics Education**, v. 19, n. 2, p. null-null, 29 jul. 2011.
- DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.
- DRIFKA, C. R. et al. Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. v. 64, n. 9, 2016.
- DVORAK, H. F. Tumors: Wounds That Do Not Heal. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650–1659, 25 dez. 1986.
- EDWARDS, G. M. et al. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9495–9500, 1998.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.
- ERNSTER, V. L.; BARCLAY, J. Increases in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast in relation to mammography: a dilemma. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 22, 1997.
- FACCIABENE, A. et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. **Nature**, v. 475, p. 226, 13 jul. 2011.
- FERREIRA, F. CXCL12-CXCR4 axis in feline mammary carcinoma. **Aging**, v. 9, n. 12, p. 2457–2458, 2017.
- FIELDS, G. B. Interstitial collagen catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 8785–8793, 2013.

- FIGUEIRA, A. C. et al. Aberrant P-cadherin expression is associated to aggressive feline mammary carcinomas. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2014.
- FIGUEIRA, A. C. et al. Characterization of α -, β - and p120-Catenin Expression in Feline Mammary Tissues and their Relation with E- and P-Cadherin. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3361–9, 2015.
- FILGUEIRA, K. D. et al. Histopathological Features of Mammary Gland Tumors in Native Domestic Female Cats from the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1304, p. 1–8, 2015.
- FILHO, O. M.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens**. [s.l: s.n.]. v. 21/03
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.
- GABRIEL, L. et al. Characterization of collagens fibers (I , III , IV) and elastin in the extracellular matrix of normal and neoplastic canine prostate. n. January, 2019.
- GADD, V. L. Combining Immunodetection with Histochemical Techniques: The Effect of Heat-induced Antigen Retrieval on Picro-Sirius Red Staining. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 12, p. 902–906, 12 set. 2014.
- GARCÍA-MENDOZA, M. G. et al. Neutrophils drive accelerated tumor progression in the collagen-dense mammary tumor microenvironment. **Breast cancer research : BCR**, v. 18, n. 1, p. 49, 11 maio 2016.
- GAY, S. et al. Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro. **Klinische Wochenschrift**, v. 53, n. 19, p. 899–902, 1975.
- GILKES, D. M. et al. NIH Public Access. **Molecular Cancer Research**, v. 73, n. 11(5), p. 456–466, 2013a.
- GILKES, D. M. et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. **Cancer research**, v. 73, n. 11, p. 3285–3296, 1 jun. 2013b.
- GIMÉNEZ, F. et al. Early Detection, Aggressive Therapy: Optimizing the Management of Feline Mammary Masses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 3, p. 214–224, 1 mar. 2010.
- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 1 jan. 2011.
- GOPINATHAN, P. A. et al. Study of Collagen Birefringence in Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma Using Picrosirius Red and Polarized Light Microscopy. **Scientifica**, n. ID 802980, p. 1–7, 2015.
- GRITSENKO, P. G.; ILINA, O.; FRIEDL, P. Interstitial guidance of cancer

invasion. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 185–199, 1 jan. 2012.

GUNASINGHE, N. P. A. D. et al. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 469–478, 2012.

GUO, S.; DENG, C. X. **Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation** *International Journal of Biological Sciences* Ivyspring International Publisher, , 2018.

GUO, Y. P. et al. Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, 2001.

HABEL, L. A. et al. Mammographic Density and Breast Cancer After Ductal Carcinoma In Situ. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 19, p. 1467–1472, 6 out. 2004.

HAHN, K. A.; BRAVO, L.; AVENELL, J. S. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 8, n. 5, p. 825–828, 1994.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1–2, p. 111–133, 1974.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. SMC-3, n. 6, p. 610–621, 1973.

HASSAN, B. B. et al. Feline Mammary Cancer. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 32–43, 2017.

HAYES, A. A.; MOONEY, S. Feline Mammary Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 15, n. 3, p. 513–520, 1985.

HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 19–26, 2012.

HUTLI, E.; NEDELJKOVIC, M.; BONYÁR, A. Dynamic behaviour of cavitation clouds: visualization and statistical analysis. **Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering**, v. 41, n. 7, p. 281, 2019.

JACOBS, T. M. et al. Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990-2006). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 2, p. 169–174, 2010.

JAFARI-KHOUSANI, K.; SOLTANIAN-ZADEH, H. Multiwavelet grading of pathological images of prostate. **IEEE Transactions on Biomedical**

Engineering, v. 50, n. 6, p. 697–704, 2003.

JEROME, N. P. et al. Characterisation of fibrosis in chemically-induced rat mammary carcinomas using multi-modal endogenous contrast MRI on a 1 . 5T clinical platform. p. 1642–1653, 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153–156, 1982.

JUNQUEIRA, L. C. U. A Simple and Sensitive Method for the Quantitative Estimation of Collagen. v. 99, p. 96–99, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S. Biology of Collagen-Proteoglycan Interaction *. v. 46, n. 5, p. 589–629, 1983.

KAKKAD, S. M.; JACOBS, L. K.; GLUNDE, K. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers : pilot study breast cancers : pilot study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 11, p. 116017–1 a 116017–7, 2012.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 582, 23 ago. 2016.

KANG, Y. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. **Cancer Cell**, v. 3, n. 6, p. 537–549, 1 jun. 2003.

KARSDAL, M. A. et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 43–56, 2017.

KAUPPILA, S. et al. Cross-linked telopeptides of type I and III collagens in malignant ovarian tumours in vivo. **British journal of cancer**, v. 81, n. 4, p. 654–661, out. 1999a.

KAUPPILA, S. et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. **The Journal of Pathology**, v. 186, n. 3, p. 262–268, 15 out. 1999b.

KAY, R. R. et al. Changing directions in the study of chemotaxis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 455, 1 jun. 2008.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KIM, H. Statistical notes for clinical researchers : assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. v. 7658, n. 2, p. 52–54, 2013.

KOJIMA, T. et al. Surface-templated hydrogel patterns prompt matrix-

dependent migration of breast cancer cells towards chemokine-secreting cells. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 68–77, 2015.

KOLLO, T. Multivariate skewness and kurtosis measures with an application in ICA. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 99, n. 10, p. 2328–2338, 2008.

KONTZOGLOU, K. et al. Correlation between Ki67 and Breast Cancer Prognosis. **Oncology (Switzerland)**, v. 84, n. 4, p. 219–225, 2013.

KOWALSKI, P. J.; RUBIN, M. A.; KLEER, C. G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. **Breast cancer research : BCR**, v. 5, n. 6, p. R217–R222, 2003.

KUHL, C. K. Review article MRI of breast tumors. v. 58, p. 46–58, 2000.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. first edit ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 619–636.

LEE, Y.-J. et al. Extracellular matrix controls insulin signaling in mammary epithelial cells through the RhoA/Rok pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 220, n. 2, p. 476–484, 23 abr. 2009.

LI, J. et al. Image texture features as indicators of beef tenderness. **Meat Science**, v. 53, n. 1, p. 17–22, 1999.

LI, S. et al. MCP-1-induced ERK/GSK-3 β /Snail signaling facilitates the epithelial–mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, p. 621, 21 mar. 2016.

LI, T. et al. The Association of Measured Breast Tissue Characteristics with Mammographic Density and Other Risk Factors for Breast Cancer. v. 14, n. February, 2005.

LIN, E. Y. et al. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 5, p. 2113–2126, 1 nov. 2003.

LIPTON, A. et al. High turnover of extracellular matrix reflected by specific protein fragments measured in serum is associated with poor outcomes in two metastatic breast cancer cohorts. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 11, p. 3027–3034, 20 jun. 2018.

LIU, X. et al. Metastatic breast cancer cells overexpress and secrete miR-218 to regulate type I collagen deposition by osteoblasts. **Breast cancer research : BCR**, v. 20, n. 1, p. 127, 22 out. 2018.

LOKATE, M. et al. Age-related Changes in Mammographic Density and Breast Cancer Risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 101–109, 2013.

LU, P. et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 12, p. 1–24, 2011.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.

MAINI, R.; AGGARWAL, H. A Comprehensive Review of Image Enhancement Techniques. **CoRR**, v. abs/1003.4, 2010.

MARDIA, K. V. Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. **Biometrika**, v. 57, n. 3, p. 519–530, 1 dez. 1970.

MARIA, R. DE et al. Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 907–912, 2005.

MARQUES, C. S. et al. Serum SDF-1 levels are a reliable diagnostic marker of feline mammary carcinoma, discriminating HER2-overexpressing tumors from other subtypes. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 105775–105789, 2017.

MASAAKI, I. et al. Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 293–299, 29 jan. 2010.

MATOS, A. J. F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 24–31, 2012.

MATSUBAYASHI, R. et al. Breast Masses with Peripheral Rim Enhancement on Dynamic Contrast-enhanced MR Images: Correlation of MR Findings with Histologic Features and Expression of Growth Factors. **Radiology**, v. 217, n. 3, p. 841–848, 1 dez. 2000.

MATSUBAYASHI, R. N. et al. Apparent Diffusion Coefficient in Invasive Ductal Breast Carcinoma: Correlation with Detailed Histologic Features and the Enhancement Ratio on Dynamic Contrast-Enhanced MR Images. **Journal of oncology**, v. 2010, p. 821048, 2010.

MCCORMACK, V. A.; SILVA, I. DOS S. Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 6, p. 1159 LP – 1169, 1 jun. 2006.

MEIGEL, W. N.; GAY, S.; WEBER, L. Dermal architecture and collagen type distribution. **Archives for Dermatological Research**, v. 259, n. 1, p. 1–10, 1977.

MENDES, T. C. et al. Comparação entre os sistemas histomorfológico e de graduação histológica para classificação prognóstica de tumores mamários em cadelas * system to prognostic classification of mammary tumor in the bitch. v. 35, n. October, p. 339–343, 2007.

MERCADO, C. L. et al. Pseudoangiomatous Stromal Hyperplasia of the Breast: Sonographic Features with Histopathologic Correlation. **The Breast Journal**, v. 10, n. 5, p. 427–432, 1 set. 2004.

MILLANTA, F. et al. Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 1, p. 30–34, 1 jan. 2005.

MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015.

MIOSGE, N. et al. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 3, p. 229–236, 2004.

MISDORP W, ROMIJN A, H. A. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. **Anticancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1793–1797, 1991.

MISDORP, W. et al. **Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat**. [s.l.] Armed Forces Institute of Pathology, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 575–606.

MONTES, G. S. et al. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. **Histochemistry**, v. 65, n. 2, p. 131–141, 1980.

MONTES, G. S. STRUCTURAL BIOLOGY OF THE FIBRES OF THE COLLAGENOUS AND ELASTIC SYSTEMS. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15–27, 1996.

MONTES, G. S.; BEZERRA, M. S. F.; JUNQUEIRA, L. C. U. Collagen distribution in tissues. 1984.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. **The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991.

MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 5, p. 391–400, 2013.

MORRIS, J. S. et al. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 3, p. 218–226, 2008.

MULAS, Â. N. D. E. L. A. S. et al. Progesterone receptors in normal , dysplastic and tumourous feline mammary glands . Comparison with oestrogen receptors status. 2002.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative Pathology of Mammary Gland

Cancers in Domestic and Wild Animals. v. 28, p. 7–21, 2007.

MUSCATELLO, L. V et al. ScienceDirect Validation of Tissue Microarray for Molecular Profiling of Canine and Feline Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, p. 8–15, 2015.

MUSCHLER, J.; STREULI, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p. 1–17, 2010.

NELSON, A. R. et al. Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 5, p. 1135, 1 mar. 2000.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 274, 1 abr. 2009.

NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in Cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 213–219, set. 2006.

NOWAK, M.; MADEJ, J.A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; DZIEGIEL, P. Expression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Antigen Ki-67 and their Reciprocal Correlation in Canine Mammary Adenocarcinomas. **Anatomy, Pathological Medicine, Forensic Veterinary**, v. 470, p. 463–469, 2008.

OKOLICSANYI, R. K. et al. Heparan sulfate proteoglycans and human breast cancer epithelial cell tumorigenicity. **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 5, p. 967–976, maio 2014.

ORLHAC, F. et al. Multiscale Texture Analysis: From 18F-FDG PET Images to Histologic Images. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 11, p. 1823–1828, 1 nov. 2016.

OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **The Breast**, v. 22, p. S66–S72, 2013.

OVERLEY, B. et al. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 4, p. 560–563, 2005.

OWEN, L. N. **Classification of Tumors in Domestic Animals**. First Ed. ed. Geneva: World Health Organization, 1980.

OZA, A. M.; BOYD, N. F. Mammographic parenchymal patterns: a marker of breast cancer risk. **Epidemiol Rev**, v. 15, 1993.

PAGET, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. **The Lancet**, v. 133, n. 3421, p. 571–573, 1889.

PANDEY, V. et al. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 429, 2014.

PANG, L. Y. et al. Feline mammary carcinoma stem cells are tumorigenic, radioresistant, chemoresistant and defective in activation of the ATM/p53 DNA damage pathway. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 414–423, 2013.

PASZEK, M. J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 241–254, 2005.

PAYAN-CARREIRA, R.; MARTINS-BESSA, A. C. Ultrasonographic assessment of the feline mammary gland. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, n. 5, p. 466–471, 1 out. 2008.

PAZUELLO, K. Estudo da Variação da Densidade Mamográfica ao Longo de um Ciclo Menstrual. 2003.

PEÑAFIEL-VERDU, C. et al. Reduced Expression of E-cadherin and β -catenin and High Expression of Basal Cytokeratins in Feline Mammary Carcinomas With Regional Metastasis. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 979–987, 2012.

PETRIC, M. et al. Correlation between Ki67 and histological grade in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 23, p. 10277–10280, 2014.

PETTERINO, C. et al. Immunohistochemical evaluation of STAT3-p-tyr705 expression in feline mammary gland tumours and correlation with histologic grade. **Research in Veterinary Science**, v. 82, n. 2, p. 218–224, 2007.

PEYROL, S. et al. Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. **The American journal of pathology**, v. 150, n. 2, p. 497–507, fev. 1997.

PIPERIGKOU, Z. et al. Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. **Matrix Biology**, v. 56, p. 4–23, 2016.

PRATT, W. K. **Processing Digital Image Processing**. [s.l: s.n.]. v. 5

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v. 4, p. 38, 26 dez. 2006.

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v. 6, p. 1–15, 2008.

PRZYBYLOWSKA, K. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 95, n. 1, p. 65–72, 2006.

PSAILA, B.; LYDEN, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 285–293, abr. 2009.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, p. 1423, 7 nov. 2013.

RAKHA, E. A. et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 19, p. 3153–3158, 1 jul. 2008.

RAMASWAMY, S. et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nature Genetics**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2003.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405–426, 1 jul. 2005.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393–413, 1 jul. 2008.

RIBEIRO, A. S. et al. P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: A proof of concept using the breast cancer model. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 5, p. 705–718, 2013.

RICH, L.; WHITTAKER, P. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING : A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. v. 22, p. 97–104, 2005.

ROCKINGER, M.; JONDEAU, E. Entropy densities with an application to autoregressive conditional skewness and kurtosis. **Journal of Econometrics**, v. 106, n. 1, p. 119–142, 2002.

ROMAGNOLI, S. Progestins to control feline reproduction: Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 9, p. 743–752, 25 ago. 2015.

RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 9, p. 938–967, 1996.

RUSSO, J. Significance of Rat mammary tumors for human risk assessment. **Toxicologic Pathology**, v. 43, n. 2, p. 145–170, 2015.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition. In: 5 ed ed. New York: WB Saunders, 2013. p. 547–556.

RUTTER, C. M. et al. Initiation , Discontinuation , and Continuing Use of Hormone Replacement Therapy. **Jama**, v. 285, n. 2, p. 171–176, 2001.

SBARBATI, A. et al. Subcutaneous adipose tissue classification. **European journal of histochemistry : EJH**, v. 54, n. 4, p. e48–e48, 21 dez. 2010.

SCHEDIN, P. et al. Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. **Molecular Carcinogenesis**, v. 41, n. 4, p. 207–220, 1 out. 2004.

SCHNEIDER, C. A. et al. NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis. v. 9, n. 7, p. 671–675, 2017.

SCHWEIGERT, A. Imunodeteção de marcadores de prognóstico em neoplasias mamárias de gatas - correlação dos padrões de classificação. p. 65, 2011.

SCIBELLI, A. et al. Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130^{CAS} in canine and feline mammary tumors. **Vet. Res.**, v. 34, n. 2, p. 193–202, mar. 2003.

SCURI, A. E. **Fundamentos da Imagem Digital por Antonio Escaño Scuri Tecgraf / PUC-Rio Janeiro de 1999**, 1999. (Nota técnica).

SEIXAS, F. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 65–71, 2011.

SILVA, M. N. et al. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 4, p. 440–445, 2017.

SKANDALIS, S. S. et al. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: Focus on the role and impact of proteoglycans. **Matrix Biology**, v. 35, p. 182–193, 2014.

SOARES, M. et al. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. **Breast**, v. 27, p. 44–51, 2016a.

SOARES, M. et al. St Gallen molecular subtypes in feline mammary carcinoma and paired metastases—disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 4053–4064, 2016b.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. B. T.-W. AND M. S. A. C. O. (FIFTH E. (Eds.). . **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)**. Saint Louis: W.B. Saunders, 2013. p. 538–556.

SPADER, M. B. **Estudo epidemiológico, classificação histológica e fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORS em tumores mamários felinos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2009.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 6, p. 415–433, 2000.

STERNLICHT, M. D. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 1, 2005.

STETLER-STEVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 5, p. 1345–1350, maio 1996.

SZAUTER, K. M. et al. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of

the skin. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 7, p. 448–456, 2005.

TAJIMA, S. et al. Distribution of macromolecular components in human dermal connective tissue. **Archives of Dermatological Research**, v. 273, n. 1–2, p. 115–120, 1982.

TAMADA, H. et al. Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 416–417, maio 2003.

TAMAMOTO, T. et al. Serum Amyloid A Promotes Invasion of Feline Mammary Carcinoma Cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 8, p. 1183–1188, 2014.

TEKGUL, S. et al. Collagen Types I and III Localization by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry in the Partially Obstructed Young Rabbit Bladder. **The Journal of Urology**, v. 156, n. 2, Supplement, p. 582–586, 1996.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

THURFJELL, E. Breast density and the risk of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 347, 2002.

TOGNI, M. et al. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 353–358, 2013.

TOMLINSON, M. J. et al. Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Evaluation of 17 Cases. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 25, n. 12, p. 435–439, dez. 1984.

TURLEY, S. J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J. L. **Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 nov. 2015.

TYAGI, N. K.; DHESY-THIND, S. Clinical practice guidelines in breast cancer. **Current Oncology**, v. 25, n. Suppl 1, p. S151–S160, 13 jun. 2018.

UNLU, O. et al. Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. v. 22, n. 1, p. 184–191, 2017.

URSIN, G. et al. Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. R605, 2005.

VACEK, P. M.; GELLER, B. M. A Prospective Study of Breast Cancer Risk Using Routine Mammographic Breast Density Measurements. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 5, p. 715 LP – 722, 1 maio 2004.

VAN DEN BOOMGAARD, R.; VAN BALEN, R. Methods for fast morphological

image transforms using bitmapped binary images. **CVGIP: Graphical Models and Image Processing**, v. 54, n. 3, p. 252–258, 1992.

VAN KUPPEVELT, T. H.; VEERKAMP, J. H.; TIMMERMANS, J. A. H. Immunoquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 775–782, 1995.

VIZOSO, F. J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British journal of cancer**, v. 96, n. 6, p. 903–911, 26 mar. 2007.

WANG, K. et al. Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. **Matrix Biology**, v. 60–61, p. 86–95, 2017.

WEBSTER, J. D. et al. Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 753–761, 27 abr. 2009.

WEGNER, K. A. et al. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. v. 65, n. 8, 2017.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 591, 1 ago. 2005.

WEIJER, K.; HART, A. A. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n. 4, p. 709–16, 1983.

WESTFALL, P. H. Kurtosis as Peakedness, 1905 - 2014. R.I.P. **The American statistician**, v. 68, n. 3, p. 191–195, 2014.

WICHA, M. S. et al. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 10, p. 3213 LP – 3217, 1 maio 1982.

WIESE, D. A. et al. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: A potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

WINTERS, S. et al. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In: LAKSHMANASWAMY, R. B. T.-P. IN M. B. AND T. S. (Ed.). **. Approaches to Understanding Breast Cancer**. [s.l.] Academic Press, 2017. v. 151p. 1–32.

WINTZER, H. - O et al. Ki- 67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 67, n. 2, p. 421–428, 1991.

WOJTYS, E. M. et al. Association Between the Menstrual Cycle and Anterior Cruciate Ligament Injuries in Female Athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 26, n. 5, p. 614–619, 1 set. 1998.

WOLF, K. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from

individual to collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 893, 8 jul. 2007.

XIONG, G. et al. Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. **BMC cancer**, v. 14, p. 1, 2014.

YAMAGAMI, T. et al. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of veterinary medical science**, v. 58, n. 11, p. 1079–83, nov. 1996.

YU, J. et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3783 LP – 3797, 1 abr. 2013.

ZAMBRANO NZ, MONTES GS, SHIGIHARA KM, SANCHEZ EM, J. L. Collagen arrangement in cartilages. **Acta Anat (Basel)**, v. 113, n. 1, p. 26–38, 1982.

ZAPPULLI, V. et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. SPEC. ISS., p. 98–106, 2005.

ZAPPULLI, V. et al. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 46–60, 16 abr. 2014.

ZHANG, K. et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 15, p. 677, 5 maio 2013.

ZHANG, M.; ZHANG, Y. **The application of adaptive enhancement algorithm based on gray entropy in mammary gland CR image**. 2012 2nd International Conference on Consumer Electronics, Communications and Networks (CECNet). **Anais...**2012

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



fmvz - unesp

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica de fibras colágenas estromais e de moléculas de adesão em carcinoma mamário de gatas." **Protocolo CEUA 0245/2017**, a ser conduzido por Mariana Fernandes Jorge, responsável/orientador Professor Dr. Júlio Lopes Sequeira, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	15/01/2018 a 09/08/2018
Nome Comum/ Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Laboratório Patologia UNIMAR e Vet-Path

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 08/02/2018

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2

Trabalho Científico aceito e publicado no XII Simpósio de Engenharia Biomédica - IX Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas, realizado pela Universidade Federal de Uberlândia, no período de 30 de Setembro de 2019 a 04 de Outubro de 2019.

Link de acesso: <https://zenodo.org/record/3459789#.XboqRIVKjIV>

DOI: 10.5281/zenodo.3459789

Análise da densidade estromal no carcinoma mamário de gatas usando atributos de imagem

Mariana Fernandes Jorge
*Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia Univerdade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP
Botucatu, Brazil
ORCID: 0000-0002-6292-8512*

Ana Cláudia Patrocínio
*Faculdade de Engenharia Elétrica
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil
ORCID: 0000-0001-9376-7689*

Gabrielle Pereira
*Faculdade de Engenharia Elétrica
Universidade Federal de Uberlândia
Uberlândia, Brazil
ORCID: 0000-0002-1482-4946*

Alessandre Hataka
*Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia Univerdade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP
Botucatu, Brazil
ORCID: 0000-0002-2023-212X*

Júlio Lopes Sequeira
*Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia Univerdade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP
Botucatu, Brazil
ORCID: 0000-0002-8685-8205*

Abstract— *Feline breast carcinoma has aggressive and invasive behavior, with biological characteristics to breast cancer in women. This paper aims to identify how collagen type I and III forms in normal breast and in grouped carcinomas according to histopathological grading. The kurtosis attribute was the most representative to quantify the numeric stromal density. Results suggest that the gain of reticular fibers occurs both in the portion of higher biological activity (periphery) and in the center.*

Keywords—*histopatologia, colágeno, colorimetria, câncer de mama, felina (key words)*

INTRODUÇÃO

As similaridades da espécie felina, como as mulheres, vão desde o arranjo estrutural do parênquima mamário à influência hormonal e a fisiologia de desenvolvimento (ZAPPULLI et al., 2005), até aos fatores biológicos que influenciam o câncer (MATOS et al., 2012), como idade de incidência, fatores de risco, aspectos prognósticos, histopatologia, padrão de metastase e resposta a terapia (HAHN; BRAVO; AVENELL, 1994).

O carcinoma mamário felino representa terceira maior prevalência na espécie, de maior ocorrência entre as fêmeas (MISDORP, 2008). Mais de 80% dos tumores mamários em gatas são malignos (HUGHES; DOBSON, 2012) de comportamento agressivo pela sua capacidade de infiltração (LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, 2007), com linfonodos regionais e pulmões como locais de eleição a metástase (MORRIS et al., 2008). O tempo médio de sobrevida esperado é inferior a um ano (SEIXAS et al., 2011). Características comportamentais que a reforcem como modelo animal adequado para os tipos de câncer de mama triplo-negativo e basal das mulheres (TAMAMOTO et al., 2014).

Os diversos fatores de risco para mulher incluem idade e etnia (WINTERS et al., 2017), que já foram considerados independentes (MCCORMACK; SILVA, 2006), porém tais fatores ainda não estão totalmente estabelecidos. O que já acontece sobre a densidade, onde seu declínio ao longo tempo representa menor risco ao desenvolvimento do cancer de mama (LOKATE et al., 2013).

O aumento da densidade estromal vem da deposição das fibras colágenas, bem estabelecido como fator de risco ao câncer de mama em mulheres (CASE et al., 2017; PROVENZANO et al., 2008). Quando o ganho esta >70%, o risco é cinco vezes maior em relação àquelas com lipossustituição progressiva (BYRNE et al., 2001).

O estroma neoplásico apresenta aspectos parecidos ao parênquima saudável, o que facilita a progressão tumoral, garantindo a heterogenicidade em toda sua extensão (DVORAK, 1986). As fibras colágenas do tecido conjuntivo de sustentação compoe a matriz intesticial (tipo I e III) que envolve o estroma (LIPTON et al., 2018).

Também apresenta influência na progressão do câncer de mama, pois a deposição excessiva de colágeno na matriz extra-celular (MEC) aumenta a liberação de fatores de crescimento, de sobrevivência e formação de aderências (PROVENZANO et al., 2006). Em mulheres, quando há inibição da síntese de colágeno se espera perda da capacidade invasiva e metastática (GILKES et al., 2013a). Neste tipo tumoral, à medida que o tumor primário cresce, a deposição focal de colágeno reorganiza o estroma (LIN et al., 2003). As células tumorais de fenótipo invasor podem realizar o movimento migratório ao longo destas fibras colágenas reticulares (PROVENZANO et al., 2006), e assim

interferir no número de células tumorais circulantes (GILKES et al., 2013a). Além disto, a alta densidade do parênquima induz um microambiente de hipóxia, outro fator promotor tumoral (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979). Ação mais esperada ao centro do tumor, enquanto na periferia devido a angiogênese é esperado como local de maior atividade biológica (MERCADO et al., 2004).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é identificar a densidade estromal do parênquima mamário de gatas segundo a coloração histoquímica PSR, através de atributos extraídos das imagens, utilizando o software ImageJ®.

METODOLOGIA

Para o grupo controle foram analisadas amostras de parênquima saudável, provenientes de gatas (cadáveres) não histerectomizadas, destinadas ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu para necropsia. Excluídos os materiais em estado de degeneração, ou proveniente de gatas com afecção reprodutiva.

As amostras de carcinoma mamário felino utilizadas formam obtidas do arquivo histopatológico do Serviço de Patologia Veterinária da Unimar – Marília - SP e do laboratório privado VetPat – Campinas – SP. Todas as gatas passaram por mastectomia como conduta terapêutica. Os tumores benignos, assim como os tumores indiferenciados ou com extensas áreas necróticas foram excluídos. As técnicas de processamento laboratorial seguiram o protocolo padronizado pelo Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Campus de Botucatu. Pelo método de coloração Hematoxilina-Eosina (HE), agrupados em baixo e alto grau, de acordo com sua diferenciação (ELSTON; ELLIS, 1991).

Para a técnica de Picrossirius Red, realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura que depois de desparafinados foram submetidos a imersão sucessiva em ácido fosfomolibdico a 0,2% , seguida de Direct Red® a 0,1% (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO) e ácido clorídrico a 0,1 N. Por fim, solução de álcool a 70%, desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

Foram analisados cinco diferentes campos de imagem em cada uma das regiões, periférica e central, adquiridas com objetiva de 20x aumento (BAUMAN et al., 2014; DRIFKA et al., 2016). A imagem com refringência das fibras colágenas ao microscópio de luz polarizada em campo escuro formam obtidas com auxílio do microscópio modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmara digital modelo AxioCam MRc (Zeiss Vision, Alemanha), e processadas pelo programa computacional de análise de imagem Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH), equipamento do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Imagem 1).

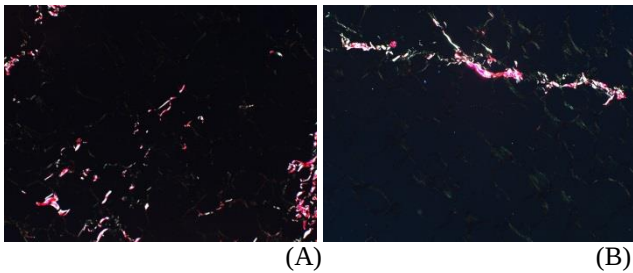


Imagem 1. Mama normal de gata, objetiva 20x aumento. Picrossirius Red, luz polarizada, segundo a localização. A) Periferia e B) centro.

Com auxílio do software ImageJ®, as imagens do grupo controle foram convertidas para oito bits, em escala de tons de cinza (SCHNEIDER et al., 2017), em seguida foram extraídos os atributos da imagem baseados no histograma da imagem, tais como: média de tons de cinza, desvio padrão, moda, skewness (medida de assimetria da distribuição de uma variável) e curtose (dispersão da variável) (KIM, 2013).

Todos estes atributos foram aplicados na compração do grupo controle aos carcinomas mamários de baixo e alto grau na busca de valores absolutos que auxiliem a mensuração da densidade estromal.

RESULTADOS

O grupo controle foi usado como parâmetro, observado descritivamente que as laminas histológicas possuem maior densidade na região central que na periferia, assim os valores numéricos buscam tal relação. O Gráfico 1 demonstra todos os atributos avaliados em colunas, enquanto o Gráfico 2 revela os três melhores atributos, destacando a curtose como o melhor deles.

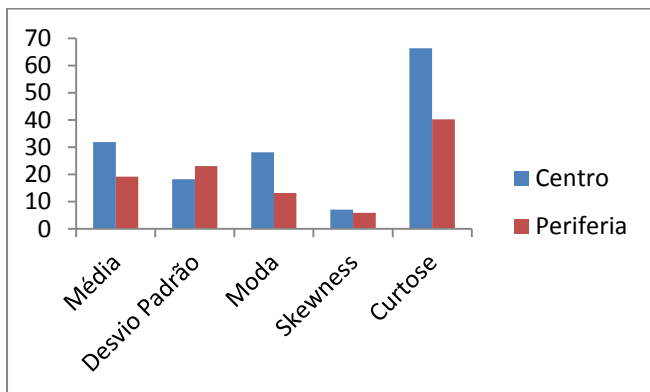


Gráfico 1. Análise de critérios representativos sobre a densidade estromal em cortes histológicos corados por PSR. Dados parciais do grupo controle

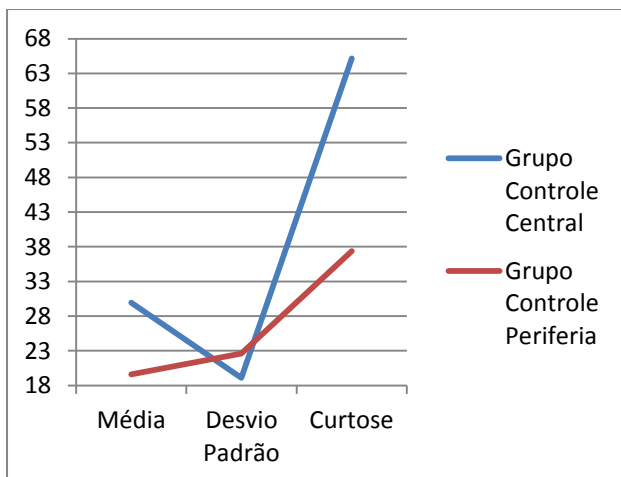


Gráfico 2. Resultado dos atributos extraídos do grupo controle segundo a região.

Ao comparar as imagens do grupo controle com os tumores de baixo e alto grau, a curtose se mostrou mais eficaz para analisar tanto a região central (Gráfico 3) como a periferia (Gráfico 4).

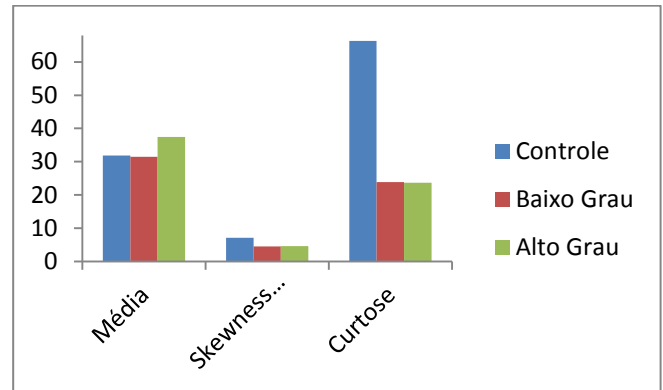


Gráfico 3. A curtose foi o atributo mais relevante ao demonstrar a densidade estromal da região central. O gráfico reproduz o resultado obtido descritivamente.

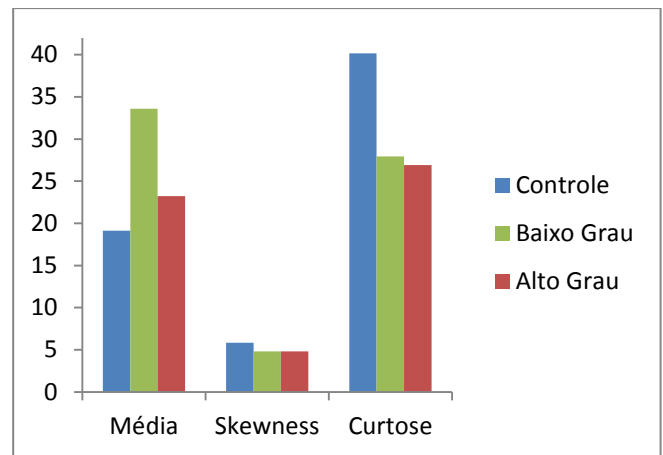


Gráfico 4. Curtose como atributo relevante também ao analisar a região periférica. Reproduz o resultado obtido descritivamente.

DISCUSSÃO

A classificação segundo graduação tem maior valor prognóstico que a tipificação histopatológica no câncer de mama de diferentes espécies (SEIXAS et al., 2011). Quanto maior o grau menor sua similaridade com o tecido original, esperado maior agressividade (MISDORP, 2008)

Pelo método PSR, o padrão de 5µm de espessura dos cortes histológicos garante a qualidade da amostra com correta birrefringência dos carboidratos que constituem as fibras colágenas, o que minimiza os artefatos de fundo (DAYAN et al., 1989). O uso do software ImageJ, para analisar imagens de cortes histológicos contribuiu para a avaliação do processo cicatricial de tecidos conjuntivos, como mostra a literatura (BAUMAN et al., 2014), com bons resultados *in vivo* na avaliação de lesões neoplásicas de mama (JEROME et al., 2018). Bem como em cães, utilizado para identificar fibras colágenas em carcinoma prostático (CALDERÓN et al., 2019), mas para gatas não há padronização de avaliação e análise.

Dentre os atributos analisados, o grupo controle foi o escolhido como referência. Devido à heterogenicidade entre os campos, representados por extensas áreas escuras, os valores de desvio padrão foram altos, assim como os valores de moda, mediana e média que formam extremos. Já os atributos assimetria e a curtose se mostraram mais

apropriados para diferenciar esta classe de imagens, concordando com a literatura (LI et al., 1999).

Segundo a estatística, os atributos de assimetria e curtose descrevem a forma da distribuição, que para medidas multivariadas ambas possuem propriedades desejáveis e conferem robustez estatística ao teste T (MARDIA, 1970).

A assimetria é uma medida significativa quando extraídas de imagens com fundo escuro e pontos brilhantes dispersos (CAMBAZA; KOSEKI; KAWAMURA, 2018), o que pode ser aplicado para análise da densidade das fibras colágenas (MONTES et al., 1980). Segundo a estatística uma distribuição é considerada simétrica quando o seu valor de inclinação é zero, mas se assimétrica, pode ser positiva, onde o valor de inclinação da cauda do lado direito é maior que a do esquerdo, ou ainda negativa com a maior parte das amostras localizadas à esquerda da média (KIM, 2013).

O atributo curtose é uma medida obtida pela combinação das caudas em relação ao resto da distribuição (CONSULTING, 2016). Caracteriza a planicidade da distribuição amostral em relação a curva de normalidade, com zero representando o normal, quando negativa indica distribuição plana com caudas leves, e quando positiva as caudas são mais altas (BROWN, 1997).

Embora seja errôneo interpretar que a curtose represente o pico da distribuição amostral, principalmente por depender do número de amostras (WESTFALL, 2014), o alto desvio padrão associado a distribuição plana no teste T (KOLLO, 2008), foram os critérios para escolha deste atributo para quantificar as fibras colágenas no carcinoma mamário das gatas pelo método PSR.

Para as amostras utilizadas na análise de atributos, a densidade foi inversamente proporcional ao valor obtido de curtose. No tecido saudável, a periferia apresentou maior densidade em relação ao centro. Ao comparar este resultado com o tecido neoplásico, houve aumento da densidade em ambas as localidades. Condiz com o esperado, mesmo nos tumores benignos de mulheres acontece o aumento da densidade estromal (MERCADO et al., 2004), o que se agrava à medida que se tornam invasivos (MATSUBAYASHI et al., 2010).

A área de maior atividade biológica, com intenso remodelamento e suporte sanguíneo é a periferia, com o aumento da densidade indicativo de agressividade (MERCADO et al., 2004). No entanto o ganho das fibras colágenas foi mais expressivo ao centro.

A função estrutural é reconhecida, com as fibras colágenas apontadas como orientadoras físicas para a invasão celular do câncer de mama em mulheres (THEOCHARIS et al., 2016). Assim o envolvimento molecular sobre o remodelamento tecidual (LIU et al., 2018) aparentemente exacerbado ao centro, pode ter relação com o comportamento agressivo do carcinoma mamário das gatas.

CONCLUSÃO

O atributo de maior diferença em valor absoluto entre as classes de imagens foi a curtose, utilizado para representar numericamente a densidade estromal.

Sugere-se que o aumento da densidade estromal também ocorre no carcinoma mamário das gatas, assim como já demonstrado em mulheres.

Com os dados parciais a região central aparenta maior representatividade quanto a atividade biológica no carcinoma mamário de gatas do que a periferia, seriam necessários novos estudos.

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores, laboratório de Patologia da Unimar (Marília) e laboratório particular VetPath (Campinas) pelas amostras de qualidade adequada.

REFERENCIAS

- AGIOSTRATIDOU, G. et al. Differential cadherin expression: Potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 12, n. 2–3, p. 127–133, 2007.
- ALBERGARIA, A. et al. P-cadherin role in normal breast development and cancer. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 7–8–9, p. 811–822, 2011.
- ALOWAMI, S. et al. Mammographic density is related to stroma and stromal proteoglycan expression. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. R129, 2003.
- AMORIM, F. V. et al. Clinical, cytological and histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, n. 6, p. 379–388, 2006.
- ARESU, L. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 33, 2011.
- AUGSBURGER, H. R.; HENZI, D. Immunohistochemical expression of collagen types I, III, IV and α -actin in the uterine horns of nulliparous and multiparous beagles. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1070–1076, 2008.
- BAUMAN, T. M. et al. Characterization of Fibrillar Collagens and Extracellular Matrix of Glandular Benign Prostatic Hyperplasia Nodules. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109102, 2 out. 2014.
- BEHA, G. et al. ScienceDirect Molecular Phenotype of Primary Mammary Tumours and Distant Metastases in Female Dogs and Cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 2–3, p. 194–197, 2014.
- BENAZZI, C. et al. Basement membrane components in mammary tumours of the dog and cat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 109, p. 241–252, 1993.
- BETZ, D. et al. Postoperative treatment outcome in canine mammary tumors. Multivariate analysis of the prognostic value of pre- and postoperatively available information. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, v. 40, n. 4, p. 235–42, 2012.
- BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. November, p. 332–337, 2004.
- BODE, M. K. et al. Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: Evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 32, n. 6, p. 1201–1207, 2000.
- BOYD, N. F. et al. Mammographic densities and the prevalence and incidence of histological types of benign breast disease. Reference Pathologists of the Canadian National Breast Screening Study. **Eur J Cancer Prev**, v. 9, 2000.
- BOYD, N. F. et al. Mammographic densities as a marker of human breast cancer risk and their use in chemoprevention. **Curr Oncol Rep**, v. 3, 2001.
- BOYD, N. F. et al. The association of breast mitogens with mammographic densities. **Br J Cancer**, v. 87, 2002.
- BRIGHT, R. A. et al. Relationship between mammographic and histologic features of breast tissue in women with benign biopsies. **Cancer**, v. 61, 1988.
- BRINCKERHOFF, C. E.; RUTTER, J. L.; BENBOW, U. Interstitial Collagenases as Markers of Tumor Progression. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4823 LP – 4830, 1 dez. 2000.
- BRISSON, B. K. et al. Type III Collagen Directs Stromal Organization and Limits Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. **The American journal of pathology**, v. 185, n. 5, p. 1471–1486, maio 2015.
- BROWN, J. D. Reliability of surveys. **Shiken: JALT Testing & Evaluation SIG**, v. 1, n. September, p. 18–21, 1997.
- BRUNETTI, B. et al. Molecular Phenotype in Mammary Tumours of Queens: Correlation between Primary Tumour and Lymph Node Metastasis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148, n. 2–3, p. 206–213, 2013.
- BURNSIDE, E. S. et al. Age-based versus Risk-based Mammography Screening in Women 40–49 Years Old: A Cross-sectional Study. **Radiology**, p. 181651, 11 jun. 2019.
- BYRNE, C. et al. Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, 1995.
- BYRNE, C. et al. Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**, v. 12, 2001.
- C.S., M. et al. CXCR4 and its ligand CXCL12 display opposite expression profiles in feline mammary metastatic disease, with the exception of HER2-

- overexpressing tumors. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, 2018.
- CALDERÓN, L. G. R. et al. Characterization of Collagen Fibers (I, III, IV) and Elastin of Normal and Neoplastic Canine Prostatic Tissues. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 1, p. 22, 2 mar. 2019.
- CALIARI, D. et al. Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2014.
- CAMBAZA, E.; KOSEKI, S.; KAWAMURA, S. The Use of Colors as an Alternative to Size in Fusarium graminearum Growth Studies. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 7, p. 100, 27 jun. 2018.
- CANNON, C. M. Cats, Cancer and Comparative Oncology. p. 111–126, 2015.
- CARRASCO, F. et al. Comparative Morphologic and Histochemical Studies on the Collagen of Vertebrate Arteries. v. 302, p. 296–302, 1981.
- CASE, A. et al. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PLoS one**, v. 12, n. 7, p. e0180448–e0180448, 6 jul. 2017.
- CASSALI, G. et al. **Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors**. [s.l.: s.n.]. v. 55
- CASSEREAU, L. D. Tissue Stiffness Drives Breast Cancer Malignant Progression. In: **UCSF**. [s.l.] <https://escholarship.org/uc/item/0kc900n3>, 2015. v. 111p. 1009–1010.
- CASTAGNARO, M. et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. **Research in Veterinary Science**, v. 65, n. 3, p. 223–226, 1998a.
- CASTAGNARO, M. et al. Tumour Grading and the One-year Post-surgical Prognosis in Feline Mammary Carcinomas. v. 119, p. 263–275, 1998b.
- CHECKA, C. M. et al. The Relationship of Mammographic Density and Age: Implications for Breast Cancer Screening. **American Journal of Roentgenology**, n. March, p. 292–295, 2012.
- CHOUAIB, S. et al. Hypoxia Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 21, 2012.
- COLPAERT, C. G. et al. The Presence of a Fibrotic Focus in Invasive Breast Carcinoma Correlates with the Expression of Carbonic Anhydrase IX and is a Marker of Hypoxia and Poor Prognosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 81, n. 2, p. 137–147, 2003.
- CONDEELIS, J.; SEGALL, J. E. Intravital imaging of cell movement in tumours. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 12, p. 921–930, 2003.
- CONSULTING, B. P. I. 1 © 2016 BPI Consulting, LLC
www.spcforexcel.com. n. February, p. 1–12, 2016.
- DAYAN, D. et al. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? **Histochemistry**, v. 93, n. 1, p. 27–29, 1989.
- DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 2007.
- DE CAMPOS, C. B. et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003–1012, 2015.
- DE LAS MULAS, J. M. et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in feline mammary gland benign and malignant lesions: comparison with biochemical assay☆. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, n. 1, p. 111–125, 2000.
- DE WEVER, O.; MAREEL, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 429–447, 2003.
- DELMAS, R. et al. Assessing Students' Conceptual Understanding after a First Course in Statistics. **Statistics Education Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 28–58, 2007.
- DIAS PEREIRA, P.; CARVALHEIRA, J.; GÄRTNER, F. Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue - An immunohistochemical study. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 2, p. 180–185, 2004.
- DOANE, D. P.; SEWARD, L. E. Measuring Skewness: A Forgotten Statistic? **Journal of Statistics Education**, v. 19, n. 2, p. null-null, 29 jul. 2011.
- DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.
- DRIFKA, C. R. et al. Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. v. 64, n. 9, 2016.
- DVORAK, H. F. Tumors: Wounds That Do Not Heal. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 26, p. 1650–1659, 25 dez. 1986.
- EDWARDS, G. M. et al. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9495–9500, 1998.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403–410, 1991.
- ERNSTER, V. L.; BARCLAY, J. Increases in ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast in relation to mammography: a dilemma. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 22, 1997.
- FACCIABENE, A. et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. **Nature**, v. 475, p. 226, 13 jul. 2011.
- FERREIRA, F. CXCL12-CXCR4 axis in feline mammary carcinoma. **Aging**, v. 9, n. 12, p. 2457–2458, 2017.
- FIELDS, G. B. Interstitial collagen catabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 8785–8793, 2013.
- FIGUEIRA, A. C. et al. Aberrant P-cadherin expression is associated to aggressive feline mammary carcinomas. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2014.
- FIGUEIRA, A. C. et al. Characterization of α -, β - and p120-Catenin Expression in Feline Mammary Tissues and their Relation with E- and P-Cadherin. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3361–9, 2015.
- FILGUEIRA, K. D. et al. Histopathological Features of Mammary Gland Tumors in Native Domestic Female Cats from the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1304, p. 1–8, 2015.
- FILHO, O. M.; NETO, H. V. **Processamento Digital de Imagens**. [s.l.: s.n.]. v. 21/03
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.
- GABRIEL, L. et al. Characterization of collagen fibers (I, III, IV) and elastin in the extracellular matrix of normal and neoplastic canine prostate. n. January, 2019.
- GADD, V. L. Combining Immunodetection with Histochemical Techniques: The Effect of Heat-induced Antigen Retrieval on Picro-Sirius Red Staining. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 12, p. 902–906, 12 set. 2014.
- GARCÍA-MENDOZA, M. G. et al. Neutrophils drive accelerated tumor progression in the collagen-dense mammary tumor microenvironment. **Breast cancer research : BCR**, v. 18, n. 1, p. 49, 11 maio 2016.
- GAY, S. et al. Immunohistochemical evidence for the presence of collagen type III in human arterial walls, arterial thrombi, and in leukocytes, incubated with collagen in vitro. **Klinische Wochenschrift**, v. 53, n. 19, p. 899–902, 1975.
- GILKES, D. M. et al. NIH Public Access. **Molecular Cancer Research**, v. 73, n. 11(5), p. 456–466, 2013a.
- GILKES, D. M. et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. **Cancer research**, v. 73, n. 11, p. 3285–3296, 1 jun. 2013b.
- GIMÉNEZ, F. et al. Early Detection, Aggressive Therapy: Optimizing the Management of Feline Mammary Masses. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 3, p. 214–224, 1 mar. 2010.
- GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 1 jan. 2011.
- GOPINATHAN, P. A. et al. Study of Collagen Birefringence in Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma Using Picrosirius Red and Polarized Light Microscopy. **Scientifica**, n. ID 802980, p. 1–7, 2015.
- GRITSENKO, P. G.; ILINA, O.; FRIEDL, P. Interstitial guidance of cancer invasion. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 185–199, 1 jan. 2012.
- GUNASINGHE, N. P. A. D. et al. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 469–478, 2012.
- GUO, S.; DENG, C. X. **Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation** International Journal of Biological Sciences Ivyspring International Publisher, , 2018.
- GUO, Y. P. et al. Growth factors and stromal matrix proteins associated with mammographic densities. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, 2001.
- HABEL, L. A. et al. Mammographic Density and Breast Cancer After Ductal Carcinoma In Situ. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 19, p. 1467–1472, 6 out. 2004.
- HAHN, K. A.; BRAVO, L.; AVENELL, J. S. Feline breast carcinoma as a pathologic and therapeutic model for human breast cancer. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 8, n. 5, p. 825–828, 1994.
- HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1–2, p. 111–133, 1974.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.
- HARALICK, R. M.; SHANMUGAM, K.; DINSTEN, I. Textural Features for Image Classification. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**, v. SMC-3, n. 6, p. 610–621, 1973.
- HASSAN, B. B. et al. Feline Mammary Cancer. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 1, p. 32–43, 2017.
- HAYES, A. A.; MOONEY, S. Feline Mammary Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 15, n. 3, p. 513–520, 1985.

- HUGHES, K.; DOBSON, J. M. Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 19–26, 2012.
- HUTLI, E.; NEDELJKOVIC, M.; BONYÁR, A. Dynamic behaviour of cavitation clouds: visualization and statistical analysis. **Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering**, v. 41, n. 7, p. 281, 2019.
- JACOBS, T. M. et al. Mammary adenocarcinomas in three male cats exposed to medroxyprogesterone acetate (1990-2006). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 2, p. 169–174, 2010.
- JAFARI-KHOUSANI, K.; SOLTANIAN-ZADEH, H. Multiwavelet grading of pathological images of prostate. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 50, n. 6, p. 697–704, 2003.
- JEROME, N. P. et al. Characterisation of fibrosis in chemically-induced rat mammary carcinomas using multi-modal endogenous contrast MRI on a 1.5T clinical platform. p. 1642–1653, 2018.
- JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153–156, 1982.
- JUNQUEIRA, L. C. U. A Simple and Sensitive Method for the Quantitative Estimation of Collagen. v. 99, p. 96–99, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S. Biology of Collagen-Proteoglycan Interaction *. v. 46, n. 5, p. 589–629, 1983.
- KAKKAD, S. M.; JACOBS, L. K.; GLUNDE, K. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers : pilot study breast cancers : pilot study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 11, p. 116017–1 a 116017–7, 2012.
- KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 582, 23 ago. 2016.
- KANG, Y. et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. **Cancer Cell**, v. 3, n. 6, p. 537–549, 1 jun. 2003.
- KARSDAL, M. A. et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 121, p. 43–56, 2017.
- KAUPPILA, S. et al. Cross-linked telopeptides of type I and III collagens in malignant ovarian tumours in vivo. **British journal of cancer**, v. 81, n. 4, p. 654–661, out. 1999a.
- KAUPPILA, S. et al. Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. **The Journal of Pathology**, v. 186, n. 3, p. 262–268, 15 out. 1999b.
- KAY, R. R. et al. Changing directions in the study of chemotaxis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 455, 1 jun. 2008.
- KESSENBRÖCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.
- KIM, H. Statistical notes for clinical researchers : assessing normal distribution (2) using skewness and kurtosis. v. 7658, n. 2, p. 52–54, 2013.
- KOJIMA, T. et al. Surface-templated hydrogel patterns prompt matrix-dependent migration of breast cancer cells towards chemokine-secreting cells. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 68–77, 2015.
- KOLLO, T. Multivariate skewness and kurtosis measures with an application in ICA. **Journal of Multivariate Analysis**, v. 99, n. 10, p. 2328–2338, 2008.
- KONTZOGLOU, K. et al. Correlation between Ki67 and Breast Cancer Prognosis. **Oncology (Switzerland)**, v. 84, n. 4, p. 219–225, 2013.
- KOWALSKI, P. J.; RUBIN, M. A.; KLEER, C. G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. **Breast cancer research : BCR**, v. 5, n. 6, p. R217–R222, 2003.
- KUHL, C. K. Review article MRI of breast tumors. v. 58, p. 46–58, 2000.
- LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHOROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. first edit ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2007. p. 619–636.
- LEE, Y.-J. et al. Extracellular matrix controls insulin signaling in mammary epithelial cells through the RhoA/Rok pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 220, n. 2, p. 476–484, 23 abr. 2009.
- LI, J. et al. Image texture features as indicators of beef tenderness. **Meat Science**, v. 53, n. 1, p. 17–22, 1999.
- LI, S. et al. MCP-1-induced ERK/GSK-3 β /Snail signaling facilitates the epithelial–mesenchymal transition and promotes the migration of MCF-7 human breast carcinoma cells. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 14, p. 621, 21 mar. 2016.
- LI, T. et al. The Association of Measured Breast Tissue Characteristics with Mammographic Density and Other Risk Factors for Breast Cancer. v. 14, n. February, 2005.
- LIN, E. Y. et al. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 163, n. 5, p. 2113–2126, 1 nov. 2003.
- LIPTON, A. et al. High turnover of extracellular matrix reflected by specific protein fragments measured in serum is associated with poor outcomes in two metastatic breast cancer cohorts. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 11, p. 3027–3034, 20 jun. 2018.
- LIU, X. et al. Metastatic breast cancer cells overexpress and secrete miR-218 to regulate type I collagen deposition by osteoblasts. **Breast cancer research : BCR**, v. 20, n. 1, p. 127, 22 out. 2018.
- LOKATE, M. et al. Age-related Changes in Mammographic Density and Breast Cancer Risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 1, p. 101–109, 2013.
- LU, P. et al. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 12, p. 1–24, 2011.
- LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of cell biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 20 fev. 2012.
- MAINI, R.; AGGARWAL, H. A Comprehensive Review of Image Enhancement Techniques. **CoRR**, v. abs/1003.4, 2010.
- MARDIA, K. V. Measures of multivariate skewness and kurtosis with applications. **Biometrika**, v. 57, n. 3, p. 519–530, 1 dez. 1970.
- MARIA, R. DE et al. Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 3, p. 907–912, 2005.
- MARQUES, C. S. et al. Serum SDF-1 levels are a reliable diagnostic marker of feline mammary carcinoma, discriminating HER2-overexpressing tumors from other subtypes. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 105775–105789, 2017.
- MASAAKI, I. et al. Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 293–299, 29 jan. 2010.
- MATOS, A. J. F. et al. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 24–31, 2012.
- MATSUBAYASHI, R. et al. Breast Masses with Peripheral Rim Enhancement on Dynamic Contrast-enhanced MR Images: Correlation of MR Findings with Histologic Features and Expression of Growth Factors. **Radiology**, v. 217, n. 3, p. 841–848, 1 dez. 2000.
- MATSUBAYASHI, R. N. et al. Apparent Diffusion Coefficient in Invasive Ductal Breast Carcinoma: Correlation with Detailed Histologic Features and the Enhancement Ratio on Dynamic Contrast-Enhanced MR Images. **Journal of oncology**, v. 2010, p. 821048, 2010.
- MCCORMACK, V. A.; SILVA, I. DOS S. Breast Density and Parenchymal Patterns as Markers of Breast Cancer Risk: A Meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 15, n. 6, p. 1159 LP – 1169, 1 jun. 2006.
- MEIGEL, W. N.; GAY, S.; WEBER, L. Dermal architecture and collagen type distribution. **Archives for Dermatological Research**, v. 259, n. 1, p. 1–10, 1977.
- MENDES, T. C. et al. Comparação entre os sistemas histomorfológico e de gradação histológica para classificação prognóstica de tumores mamários em cadelas * system to prognostic classification of mammary tumor in the bitch. v. 35, n. October, p. 339–343, 2007.
- MERCADO, C. L. et al. Pseudoangiomatous Stromal Hyperplasia of the Breast: Sonographic Features with Histopathologic Correlation. **The Breast Journal**, v. 10, n. 5, p. 427–432, 1 set. 2004.
- MILLANTA, F. et al. Overexpression of HER-2 in Feline Invasive Mammary Carcinomas: An Immunohistochemical Survey and Evaluation of Its Prognostic Potential. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 1, p. 30–34, 1 jan. 2005.
- MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015.
- MIOSEGE, N. et al. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 3, p. 229–236, 2004.
- MISDORP W, ROMIJN A, H. A. Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. **Anticancer Research**, v. 11, n. 5, p. 1793–1797, 1991.
- MISDORP, W. et al. **Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat**. [s.l.] Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 575–606.
- MONTES, G. S. et al. Histochemical and morphological characterization of reticular fibers. **Histochemistry**, v. 65, n. 2, p. 131–141, 1980.
- MONTES, G. S. STRUCTURAL BIOLOGY OF THE FIBRES OF THE COLLAGENOUS AND ELASTIC SYSTEMS. **Cell Biology International**, v. 20, n. 1, p. 15–27, 1996.
- MONTES, G. S.; BEZERRA, M. S. F.; JUNQUEIRA, L. C. U. Collagen distribution in tissues. 1984.
- MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. **The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of**

- collagen. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991.
- MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 5, p. 391–400, 2013.
- MORRIS, J. S. et al. Expression of TopBP1 in canine mammary neoplasia in relation to histological type, Ki67, ER α and p53. *Veterinary Journal*, v. 175, n. 3, p. 218–226, 2008.
- MULAS, A. N. D. E. L. A. S. et al. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumorous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. 2002.
- MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative Pathology of Mammary Gland Cancers in Domestic and Wild Animals. v. 28, p. 7–21, 2007.
- MUSCATELLO, L. V et al. ScienceDirect Validation of Tissue Microarray for Molecular Profiling of Canine and Feline Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, p. 8–15, 2015.
- MUSCHLER, J.; STREULI, C. H. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 2, n. 10, p. 1–17, 2010.
- NELSON, A. R. et al. Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 5, p. 1135, 1 mar. 2000.
- NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, p. 274, 1 abr. 2009.
- NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, v. 2, n. 3, p. 213–219, set. 2006.
- NOWAK, M.; MADEJ, J.A.; PODHORSKA-OKOLOW, M.; DZIEGIEL, P. Expression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Antigen Ki-67 and their Reciprocal Correlation in Canine Mammary Adenocarcinomas. *Anatomy, Pathological Medicine, Forensic Veterinary*, v. 470, p. 463–469, 2008.
- OKOLICSANYI, R. K. et al. Heparan sulfate proteoglycans and human breast cancer epithelial cell tumorigenicity. *Journal of cellular biochemistry*, v. 115, n. 5, p. 967–976, maio 2014.
- ORLHAC, F. et al. Multiscale Texture Analysis: From 18F-FDG PET Images to Histologic Images. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 57, n. 11, p. 1823–1828, 1 nov. 2016.
- OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast*, v. 22, p. S66–S72, 2013.
- OVERLEY, B. et al. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 19, n. 4, p. 560–563, 2005.
- OWEN, L. N. *Classification of Tumors in Domestic Animals*. First Ed. ed. Geneva: World Health Organization, 1980.
- OZA, A. M.; BOYD, N. F. Mammographic parenchymal patterns: a marker of breast cancer risk. *Epidemiol Rev*, v. 15, 1993.
- PAGET, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, v. 133, n. 3421, p. 571–573, 1889.
- PANDEY, V. et al. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. *Breast Cancer Research*, v. 16, n. 5, p. 429, 2014.
- PANG, L. Y. et al. Feline mammary carcinoma stem cells are tumorigenic, radioresistant, chemoresistant and defective in activation of the ATM/p53 DNA damage pathway. *The Veterinary Journal*, v. 196, n. 3, p. 414–423, 2013.
- PASZEK, M. J. et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, v. 8, n. 3, p. 241–254, 2005.
- PAYAN-CARREIRA, R.; MARTINS-BESSA, A. C. Ultrasonographic assessment of the feline mammary gland. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 10, n. 5, p. 466–471, 1 out. 2008.
- PAZUELLO, K. Estudo da Variação da Densidade Mamográfica ao Longo de um Ciclo Menstrual. 2003.
- PEÑAFIEL-VERDU, C. et al. Reduced Expression of E-cadherin and β -catenin and High Expression of Basal Cytokeratins in Feline Mammary Carcinomas With Regional Metastasis. *Veterinary Pathology*, v. 49, n. 6, p. 979–987, 2012.
- PETRIC, M. et al. Correlation between Ki67 and histological grade in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 15, n. 23, p. 10277–10280, 2014.
- PETTERINO, C. et al. Immunohistochemical evaluation of STAT3-p-tyr705 expression in feline mammary gland tumours and correlation with histologic grade. *Research in Veterinary Science*, v. 82, n. 2, p. 218–224, 2007.
- PEYROL, S. et al. Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *The American journal of pathology*, v. 150, n. 2, p. 497–507, fev. 1997.
- PIPERIGKOU, Z. et al. Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. *Matrix Biology*, v. 56, p. 4–23, 2016.
- PRATT, W. K. *Processing Digital Image Processing*. [s.l.: s.n.]. v. 5
- PROVENZANO, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Medicine*, v. 4, p. 38, 26 dez. 2006.
- PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine*, v. 6, p. 1–15, 2008.
- PRZYBYŁOWSKA, K. et al. Polymorphisms of the promoter regions of matrix metalloproteinases genes MMP-1 and MMP-9 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 95, n. 1, p. 65–72, 2006.
- PSAILA, B.; LYDEN, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature reviews. Cancer*, v. 9, n. 4, p. 285–293, abr. 2009.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, v. 19, p. 1423, 7 nov. 2013.
- RAKHA, E. A. et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 19, p. 3153–3158, 1 jul. 2008.
- RAMASWAMY, S. et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2003.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 42, n. 4, p. 405–426, 1 jul. 2005.
- RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested Guidelines for Immunohistochemical Techniques in Veterinary Diagnostic Laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 20, n. 4, p. 393–413, 1 jul. 2008.
- RIBEIRO, A. S. et al. P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: A proof of concept using the breast cancer model. *Journal of Pathology*, v. 229, n. 5, p. 705–718, 2013.
- RICH, L.; WHITTAKER, P. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING: A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. v. 22, p. 97–104, 2005.
- ROCKINGER, M.; JONDEAU, E. Entropy densities with an application to autoregressive conditional skewness and kurtosis. *Journal of Econometrics*, v. 106, n. 1, p. 119–142, 2002.
- ROMAGNOLI, S. Progestins to control feline reproduction: Historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 17, n. 9, p. 743–752, 25 ago. 2015.
- RUSSO, I. H.; RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environmental Health Perspectives*, v. 104, n. 9, p. 938–967, 1996.
- RUSSO, J. Significance of Rat mammary tumors for human risk assessment. *Toxicologic Pathology*, v. 43, n. 2, p. 145–170, 2015.
- RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th Edition. In: 5 ed ed. New York: WB Saunders, 2013. p. 547–556.
- RUTTER, C. M. et al. Initiation, Discontinuation, and Continuing Use of Hormone Replacement Therapy. *Jama*, v. 285, n. 2, p. 171–176, 2001.
- SBARBATI, A. et al. Subcutaneous adipose tissue classification. *European journal of histochemistry : EJH*, v. 54, n. 4, p. e48–e48, 21 dez. 2010.
- SCHEDIN, P. et al. Mammary ECM composition and function are altered by reproductive state. *Molecular Carcinogenesis*, v. 41, n. 4, p. 207–220, 1 out. 2004.
- SCHNEIDER, C. A. et al. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. v. 9, n. 7, p. 671–675, 2017.
- SCHWEIGERT, A. Imunodeteção de marcadores de prognóstico em neoplasias mamárias de gatas - correlação dos padrões de classificação. p. 65, 2011.
- SCIBELLI, A. et al. Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130^{Cas} in canine and feline mammary tumors. *Vet. Res.*, v. 34, n. 2, p. 193–202, mar. 2003.
- SCURI, A. E. *Fundamentos da Imagem Digital por Antonio Escaño Scuri Tecgraf / PUC-Rio Janeiro de 1999*, 1999. (Nota técnica).
- SEIXAS, F. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, v. 187, n. 1, p. 65–71, 2011.
- SILVA, M. N. et al. Histologic evaluation of Ki-67 and cleaved caspase-3 expression in feline mammary carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 19, n. 4, p. 440–445, 2017.
- SKANDALIS, S. S. et al. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: Focus on the role and impact of proteoglycans. *Matrix Biology*, v. 35, p. 182–193, 2014.
- SOARES, M. et al. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. *Breast*, v. 27, p. 44–51, 2016a.
- SOARES, M. et al. St Gallen molecular subtypes in feline mammary carcinoma and paired metastases—disease progression and clinical implications from a 3-year follow-up study. *Tumor Biology*, v. 37, n. 3, p. 4053–4064, 2016b.
- SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. B. T.-W. AND M. S. A. C. O. (FIFTH E. (Eds.).). *Withrow and MacEwen's*

- Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition).** Saint Louis: W.B. Saunders, 2013. p. 538–556.
- SPADER, M. B. **Estudo epidemiológico, classificação histológica e fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORS em tumores mamários felinos.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2009.
- STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 10, n. 6, p. 415–433, 2000.
- STERNLICHT, M. D. Key stages in mammary gland development: The cues that regulate ductal branching morphogenesis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 1, 2005.
- STETLER-STEVENSON, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 5, p. 1345–1350, maio 1996.
- SZAUTER, K. M. et al. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 7, p. 448–456, 2005.
- TAJIMA, S. et al. Distribution of macromolecular components in human dermal connective tissue. **Archives of Dermatological Research**, v. 273, n. 1–2, p. 115–120, 1982.
- TAMADA, H. et al. Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 416–417, maio 2003.
- TAMAMOTO, T. et al. Serum Amyloid A Promotes Invasion of Feline Mammary Carcinoma Cells. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 8, p. 1183–1188, 2014.
- TEKGUL, S. et al. Collagen Types I and III Localization by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry in the Partially Obstructed Young Rabbit Bladder. **The Journal of Urology**, v. 156, n. 2, Supplement, p. 582–586, 1996.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- THURFJELL, E. Breast density and the risk of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 347, 2002.
- TOGNI, M. et al. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 353–358, 2013.
- TOMLINSON, M. J. et al. Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Evaluation of 17 Cases. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 25, n. 12, p. 435–439, dez. 1984.
- TURLEY, S. J.; CREMASCO, V.; ASTARITA, J. L. **Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment** *Nature Reviews Immunology* Nature Publishing Group, , 1 nov. 2015.
- TYAGI, N. K.; DHESY-THIND, S. Clinical practice guidelines in breast cancer. **Current Oncology**, v. 25, n. Suppl 1, p. S151–S160, 13 jun. 2018.
- UNLU, O. et al. Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. v. 22, n. 1, p. 184–191, 2017.
- URSIN, G. et al. Greatly increased occurrence of breast cancers in areas of mammographically dense tissue. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. R605, 2005.
- VACEK, P. M.; GELLER, B. M. A Prospective Study of Breast Cancer Risk Using Routine Mammographic Breast Density Measurements. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 5, p. 715 LP – 722, 1 maio 2004.
- VAN DEN BOOMGAARD, R.; VAN BALEN, R. Methods for fast morphological image transforms using bitmapped binary images. **CVGIP: Graphical Models and Image Processing**, v. 54, n. 3, p. 252–258, 1992.
- VAN KUPPEVELT, T. H.; VEERKAMP, J. H.; TIMMERMANS, J. A. H. Immunquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 8, p. 775–782, 1995.
- VIZOSO, F. J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. **British journal of cancer**, v. 96, n. 6, p. 903–911, 26 mar. 2007.
- WANG, K. et al. Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. **Matrix Biology**, v. 60–61, p. 86–95, 2017.
- WEBSTER, J. D. et al. Effects of Prolonged Formalin Fixation on Diagnostic Immunohistochemistry in Domestic Animals. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 753–761, 27 abr. 2009.
- WEGNER, K. A. et al. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. v. 65, n. 8, 2017.
- WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 591, 1 ago. 2005.
- WEIJER, K.; HART, A. A. Prognostic factors in feline mammary carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n. 4, p. 709–16, 1983.
- WESTFALL, P. H. Kurtosis as Peakedness, 1905 - 2014. **R.I.P. The American statistician**, v. 68, n. 3, p. 191–195, 2014.
- WICHA, M. S. et al. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 10, p. 3213 LP – 3217, 1 maio 1982.
- WIESE, D. A. et al. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: A potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.
- WINTERS, S. et al. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In: LAKSHMANASWAMY, R. B. T.-P. IN M. B. AND T. S. (Ed.). **Approaches to Understanding Breast Cancer.** [s.l.] Academic Press, 2017. v. 151p. 1–32.
- WINTZER, H. - O et al. Ki- 67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 67, n. 2, p. 421–428, 1991.
- WOJTYS, E. M. et al. Association Between the Menstrual Cycle and Anterior Cruciate Ligament Injuries in Female Athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 26, n. 5, p. 614–619, 1 set. 1998.
- WOLF, K. et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 893, 8 jul. 2007.
- XIONG, G. et al. Prolyl-4-hydroxylase alpha subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition. **BMC cancer**, v. 14, p. 1, 2014.
- YAMAGAMI, T. et al. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. **The Journal of veterinary medical science**, v. 58, n. 11, p. 1079–83, nov. 1996.
- YU, J. et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3783 LP – 3797, 1 abr. 2013.
- ZAMBRANO NZ, MONTES GS, SHIGIHARA KM, SANCHEZ EM, J. L. Collagen arrangement in cartilages. **Acta Anat (Basel)**, v. 113, n. 1, p. 26–38, 1982.
- ZAPPULLI, V. et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. SPEC. ISS., p. 98–106, 2005.
- ZAPPULLI, V. et al. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 46–60, 16 abr. 2014.
- ZHANG, K. et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 15, p. 677, 5 maio 2013.
- ZHANG, M.; ZHANG, Y. **The application of adaptive enhancement algorithm based on gray entropy in mammary gland CR image.** 2012 2nd International Conference on Consumer Electronics, Communications and Networks (CECNet). **Anais...**2012

ANEXO 3

Trabalho a ser submetido ao *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* (BJVP).

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope

Brazilian Journal of Veterinary Pathology publishes original full papers, invited review articles, short communications, case reports, letters to the Editor, and Editors viewpoint. The scope of BJVP includes diagnostic, comparative, and experimental pathology of domestic, laboratory or wildlife animal species. Studies in the field of toxicological and clinical pathology are welcome as well.

Manuscripts submitted for publication in the BJVP must not be under consideration, accepted for publication, or published elsewhere.

With the exception of letters to the Editor and Editors viewpoint, all manuscripts are subjected to peer review by at least two reviewers. BJVP may eventually publish abstracts of scientific meetings in the field of Veterinary Pathology.

Categories

Letter to the Editor: must include comments and/or additional information concerning articles published in BJVP. It may contain figures or tables, and appropriate references.

Original full paper: must report a complete original study within the scope of BJVP. It must include title, author names and affiliations, abstract (up to 250 words), key words, introduction, material and methods, results, discussion, and references. Results and discussion may be combined, and a subheading "acknowledgements" may be added for acknowledging collaborators and funding.

Short communication: it must include title, author names and affiliations, abstract (up to 250 words), key words, text without subheadings, and references. A subheading "acknowledgements" may be added for acknowledging collaborators and funding.

Case report: it must include title, author names and affiliations, abstract (up to 250 words), key words, introduction, case description, discussion, and references. A subheading "acknowledgements" may be added for acknowledging collaborators and funding.

Review article: Only invited review manuscripts will be subjected to peer review. It must include title, author names and affiliations, abstract (up to 250 words), key words, text (subheadings are optional), and references. A subheading "acknowledgements" may be added for acknowledging collaborators and funding.

Ethics in animal experimentation

Experimental studies must have been previously approved by an Institutional Committee for Animal Use, following guidelines compatible with local and Brazilian legislation. A statement confirming approval by an institutional committee and its corresponding reference number must be included in the material and methods section.

The periodic "Brazilian Journal of Veterinary Pathology" supports the policies for registration of clinical assays of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), recognizing the importance of these initiatives for the registration and international dissemination of information on clinical assays. Therefore, only be accepted for publication, from 2007, the clinical research articles that have received an identification number in one of the clinical assays registries validated by the criteria established by WHO and ICMJE, whose addresses are available on the site ICMJS. The number of identification should be informed at the end of the abstract

Manuscript format

Manuscripts should be written in English. Authors are strongly encouraged to seek help from a native English speaker or English language editing services to review the manuscript prior to submission.

Manuscripts should be submitted as .doc file. It should be typed using the Times New Roman 12 pt font, with double line spacing throughout the manuscript, and 2 cm margins. Lines and pages must be numbered.

Tables and figure legends should be added at the end of the manuscript (after the references).

The corresponding author should be indicated by an asterisk after his/her name, with indication of his/her contact information in the title page.

Figures

Figures should be saved as individual .jpg files, and they should not be embedded in the text. Figures must be high-quality (at least 300 dpi), and they must have perfect focus and contrast. Micrographs must have a clear white background. Magnification of the objective used to generate the micrograph should be indicated in the legend or, alternatively, a magnification bar may be included in the lower right corner of the micrograph, indicating the corresponding size of the bar in the figure legend.

References

Authors are strongly advised to look at Vancouver Guide for Authors (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>) for proper formatting.

References must be listed in alphabetical order and numbered. Reference citations in the text must contain only the number of the reference within parentheses, e.g. (4, 17).

Journal titles should be abbreviated in accordance with Index Medicus/MEDLINE.

References should be formatted according to the examples given below:

1. Buzzoni R, Torre SD, Cortinovis D, Catena L. Case report of synchronous multicentric osteosarcoma and review of the literature: the importance of autopsy for diagnosis. *Tumori*. 2005;91:90-92.
2. Crowe MW, Swerczek TW. Equine congenital defects. *Am J Vet Res*. 1985;46(2):353-8.
3. Cudd TA, Mayhew IG, Cottrill CM. Agensis of the corpus callosum with cerebellar vermian hypoplasia in a foal resembling the DandyWalker syndrome: pre-mortem diagnosis by clinical evaluation and CT scanning. *Eq Vet J*. 1989;21(5):378-81.
4. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. London: McGraw Hill Book Co.; 1968. 258 p.
5. Maxie MG, Youssef S. Nervous system. In: Maxie MG, editor. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of domestic animals*. Philadelphia: Elsevier; 2007. p. 281-458.

Supplementary materials

Supplementary materials such as raw data sets, spread sheets, videos, among others, may be submitted along with the manuscript, when these materials are not suitable for inclusion in the manuscript and provide relevant additional information.

Manuscript submission

Manuscripts are submitted at the following website:

<http://bjvp.org.br/submitting-a-manuscript/>

The manuscript must be submitted as a .doc file, and all figures must be submitted as .jpg files within one single compressed .zip folder.

Supplementary materials must be included in the same compressed folder as the figure files.

A cover letter must be typed or copied directly within the correspondent box. In the cover letter, authors must state that: (i) the manuscript is not published or under consideration for publication elsewhere, (ii) that all coauthors merit coauthorship, and that they all agree with the contents of the manuscript and with the order they are listed as coauthors. The cover letter should also describe the relevance, originality and scientific contribution of the manuscript.

Authors must agree with the transfer of the copyright to the BJVP.

Quantificação da densidade estromal do tecido mamário saudável e neoplásico de gatas pelo método histoquímico *Picrossirius Red*

Mariana Fernandes Jorge^{1*}, Ana Cláudia Patrocínio², Alessandre Hataka³, Júlio Lopes Sequeira⁴

¹ Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Botucatu.

² Professora Associada Doutora da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia

³ Professor Assistente Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu

⁴ Professor Assistente Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu

*Autor correspondente: Mariana Fernandes Jorge.

1 Resumo

2 O carcinoma mamário felino não é o mais prevalente entre a espécie, mas seu
3 comportamento agressivo representa baixa expectativa de vida. São comparados os tipos mais
4 indiferenciados do câncer de mama das mulheres. O enrijecimento tecidual induzido pelo acúmulo
5 de fibras colágenas está relacionado a fator de risco a carcinogênese nas mulheres saudáveis e a
6 agressividade nas que possuem o carcinoma mamário, o que também pode acontecer nas gatas.
7 Através da histoquímica *Picrossiriu Red* (PSR), utilizando os softwares de processamento de
8 imagem Image.J[®] e MatLab[®], os atributos *kurtosis* e entropia tiveram seus valores médios
9 agrupados em grupo controle, carcinomas de baixo e alto grau, analisados com variância
10 unidirecional ANOVA, teste de comparação múltipla de Bonferroni ($p < 0,01$). Na interpretação da
11 dinâmica estromal importante analisar as regiões central e periférica. Como o suporte sanguíneo
12 vem da periferia, esperado o aumento da densidade dos grupos de carcinoma em relação ao
13 saudável, que foi significativo segundo a entropia. O mesmo pode ser dito da região central, onde
14 houve o ganho significativo de fibras colágenas dos tumores indicado pela *kurtosis*. É possível
15 concluir que o aumento da densidade estromal nos carcinomas mamários das gatas esta presente
16 independente da sua graduação, e acontece em ambas às regiões.

17 **Palavras-chave:** carcinoma, felino, colágeno, matriz extracelular, câncer de mama.

18

19 **Introdução**

20 O carcinoma mamário em gatas apresenta terceira maior incidência dentre as neoplasias que
21 acometem os felinos (1,2), de comportamento agressivo em cerca de 80% dos tumores
22 diagnosticados (3), semelhante aos carcinomas de tipo basal e triplo-negativo que acometem as
23 mulheres (4–7), com forte potencial de uso em estudos comparativos (8).

24 O diagnóstico histopatológico embasado no sistema de Nottingham (9) classifica os
25 carcinomas mamários felinos em tipo e grau, sendo que a graduação histopatológica de maior valor
26 prognóstico no câncer de mama de diferentes espécies (10). Quanto menor o grau mais similar ao
27 tecido original, assim o comportamento tende a ser menos agressivo (2).

28 Os fatores biológicos que influenciam a carcinogênese nas mulheres são parecidos aos da gata
29 (11,12). Dentre eles, o aumento da densidade estromal pela deposição exagerada das fibras
30 colágenas, é considerada fator de risco ao câncer de mama em mulheres (13). A deposição anormal
31 de colágeno é detectada em exames de acompanhamento, auxiliar no diagnóstico precoce da doença
32 (14), como no prognóstico nos casos onde o carcinoma mamário já está instalado (15).

33 Existem inúmeras formas de interação entre a periferia e o centro, e graças a esta mutualidade
34 entre estes microambientes, as células estromais que circundam o tumor também estão envolvidas
35 nos estágios de iniciação, progressão, metástase, além de possuir relação com resistência terapêutica
36 em tumores sólidos (16). Como se tratar de parênquima glandular, a falta de padronização da
37 distribuição periférica e central do estromal é citada como empecilho na interpretação dos
38 resultados, o que inviabiliza a comparação com o tecido normal (17). Assim todas as amostras do
39 trabalho, incluindo o tecido mamário normal das gatas foram analisados segundo sua distribuição.

40 A periferia possui rica vascularização, maior atividade biológica, sendo a região de maior
41 viabilidade ao processo de invasão (18,19). O aumento nas borda ou periferia do tumor de mama,
42 pode ser indicativo de malignidade (20).

43 Ao centro tumoral ocorre a hipóxia tecidual que, além de ser força motriz às células
44 cancerígenas também contribui para seleção de clones agressivos (21,22). A condição de baixa

45 oxigenação do microambiente tumoral estimula e secreção de fatores quimiotáticos às células de
46 defesa, que são recrutadas até a periferia, onde sofrem alterações por promotores tumorais e assim
47 passam a beneficiar o processo de invasão (23).

48 Como há inúmeras formas de manipulação e análise de imagens através de operações
49 computacionais (24), a combinação de diferentes atributos torna o processo mais eficaz e
50 aperfeiçoado (25). A *kurtosis* indica planicidade da distribuição dos pixels, quando positiva possui
51 boa confiabilidade estatística (26). Nas imagens binárias analisadas neste trabalho, os pontos claros
52 representam as fibras colágenas que em relação ao fundo escuro, estavam em menor quantidade.
53 Assim, o valor do atributo *kurtosis* é inversamente proporcional à densidade estromal.

54 A entropia avalia a irregularidade na distribuição dos pixels, diretamente proporcional ao seu
55 valor (27), utilizada na avaliação de neoplasias prostáticas (28), como em mama de mulheres,
56 associada a confiabilidade dos resultados obtidos pelo processamento de imagens (29).

57 O objetivo deste trabalho é identificar a relação entre a densidade estromal e a agressividade
58 do carcinoma mamário de gatas, segundo a distribuição periférica e central do tecido pelo método
59 histoquímico Picrossirius Red, através do processamento digital de imagens.

60

61 **Material e métodos**

62 Incluídas no grupo controle quatro amostras de mama provenientes de gatas não
63 histerectomizadas destinadas ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e
64 Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu. Em comparação a mulher e a cadela no período de
65 anestro, a glândula mamária das gatas tem menor espessura, assim gatas com menos de 40 dias de
66 gestação são consideradas com densidade mamária compatível com normal (30) e também forma
67 incluídas. Excluídos os materiais em estado de degeneração, ou proveniente de gatas com afecção
68 reprodutiva.

69 Analisadas 31 amostras de carcinoma mamário felino oriundas do arquivo histopatológico
70 do Serviço de Patologia Veterinária da Unimar - Marília - SP e do laboratório privado VetPat -

71 Campinas - SP, foram de gatas mastectomizadas como conduta terapêutica. Incluídos os tipos
72 histopatológicos de maior frequência de acometimento, os túbulo-papilíferos, os sólidos e os
73 cribriformes (10). Tumores benignos, ou com extensas áreas de necrose, assim como os carcinomas
74 sem concordância entre os patologistas, não foram incluídos.

75 Todas as técnicas de processamento laboratorial aqui descritas respeitaram o protocolo
76 padronizado pelo Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina
77 Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu.

78 Coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) que permitiu a classificação segundo a graduação
79 pelo sistema de Nottingham, o qual é embasado em mulheres (31), também indicado para as gatas
80 (9). Na intenção de obter um percentual amostral mais equilibrado, as amostras foram classificadas
81 em baixa (grau I e II) ou alta (grau III) graduação, metodologia já empregada em trabalhos com
82 carcinoma mamário de gatas (32,33) e de mulheres (34).

83 Pela técnica de Picrossirius Red, os cortes histológicos com 5 µm de espessura foram
84 desparafinados e submetidos a imersão sucessiva em ácido fosfomolibdico a 0,2%, seguida de
85 Direct Red® a 0,1% (Direct Red 36554-8, Sigma Chemical CO) e ácido clorídrico a 0,1 N. Por fim,
86 solução de álcool a 70%, desidratação, diafanização e montagem em resina sintética.

87 Para cada região, periferia e centro, foram analisados cinco campos diferentes de imagem
88 sobre luz polarizada em campo escuro com objetiva de 20x aumento, obtidas com auxílio do
89 microscópio Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmara digital e processadas
90 pelo programa Axiovision 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH), equipamento do Serviço de
91 Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP.

92 A captura das imagens respeitou a distribuição. No tecido normal, a periferia foi delimitada
93 abaixo da epiderme, e no tecido neoplásico pelas bordas do tumor. A porção central, do tecido
94 saudável foi representada pelos campos adjacentes centralmente a periferia, e dos carcinomas, as
95 porções intralobulares. Regiões de alta densidade estromal de derme, assim como as regiões ricas
96 em artérias, não foram incluídas na análise digital das imagens.

97 Através do software ImageJ[®], as imagens foram convertidas para oito bits, em escala de tons
98 de cinza (35). Com base no histograma das imagens, extraídos atributos com estatística de primeira
99 ordem (média de tons de cinza, desvio padrão e moda), como multivariados (skewness - medida de
100 assimetria da distribuição de uma variável e *kurtosis* - dispersão da variável) (36).

101 As imagens foram processadas digitalmente em um algoritmo desenvolvido em Matlab[®]
102 para extrair o atributo de textura, a entropia, eembasada na matriz de correlação dos pixels (37).

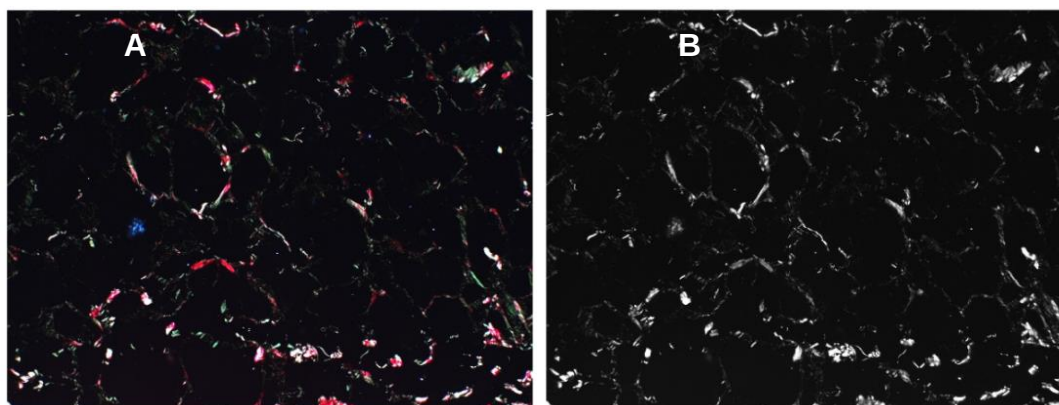
103 O valor médio obtido por cada um dos atributos do grupo controle, segundo distribuição,
104 foram comparados entre si. A análise estatística com auxílio do software GraphPad 5 (GraphPad
105 Software Inc[®], La Jolla, CA) ANOVA com variância unidirecional, seguida pelo teste de
106 comparação múltipla de Bonferroni, com valor de $p < 0,01$.

107

108 Resultados

109 As imagens processadas por ambos os softwares convertidas em 8 bits de tons de cinza para
110 minimizar os ruídos de fundo e melhorar a qualidade dos resultados estatísticos (Figura 1).

111



112 **Figura 1.** Amostra do grupo controle. Imagem capturada em campo escuro sob luz polarizada de
113 corte histológico corado por PSR (A). A mesma imagem depois de transformada em 8 bits (B).

114

115 Ao analisar estatisticamente os atributos extraídos das imagens do grupo controle, a *kurtosis*
116 na região central e a entropia para a periferia, foram melhores para interpretar a densidade estromal
117 do tecido mamário, o que pode ser observado na Figura 2.

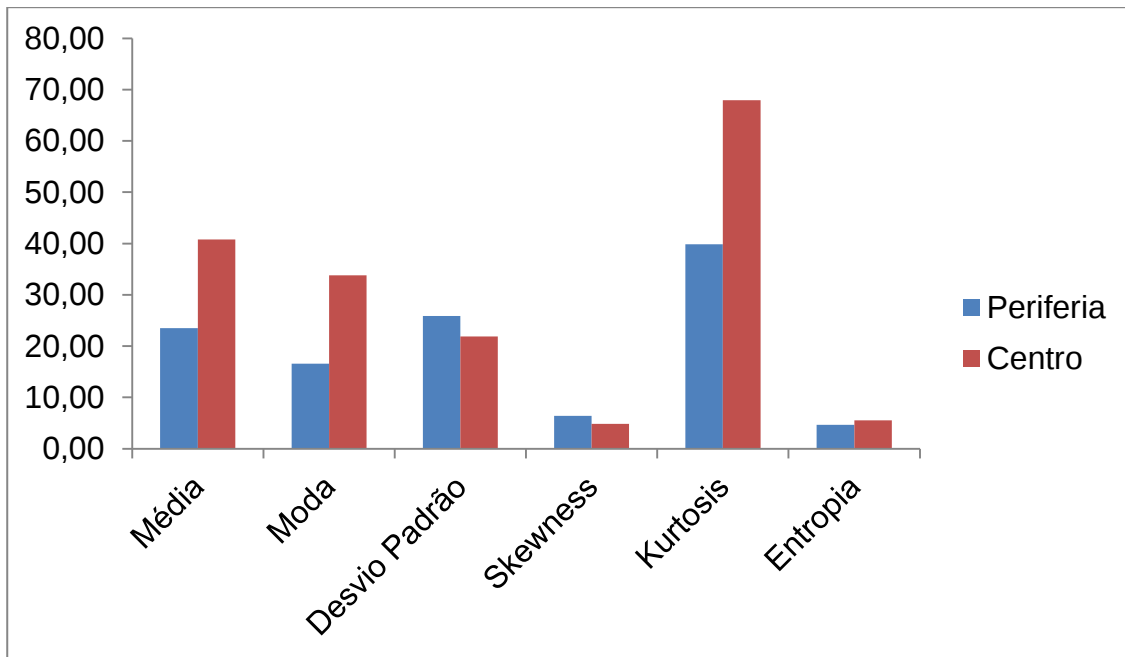


Figura 2. Valores médios para cada uma das variáveis do grupo controle quanto a sua localização.

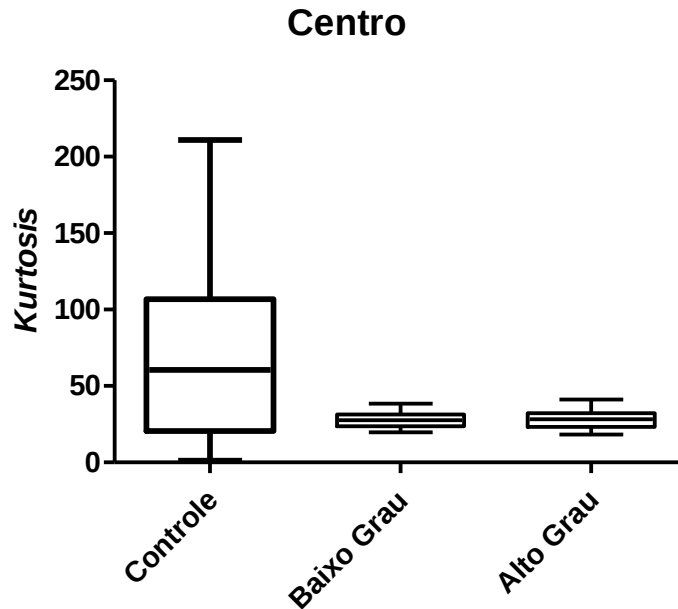
Depois de classificada a graduação de cada um dos 31 carcinomas, agrupados segundo a diferenciação, com 16 amostras (51,6%) de baixo grau, e 15 amostras (48,4%) de alto grau, grupos amostrais equilibrados entre si. Estabelecido os atributos de melhor confiabilidade, obtido valores médios de *kurtosis* e entropia para ambas regiões (Tabela 1).

Tabela 1. Valor médio obtido de *kurtosis* e entropia no tecido saudável, e nos carcinomas mamários de gatas agrupados segundo a baixa (grau I e II) e alta (grau III) graduação histopatológica.

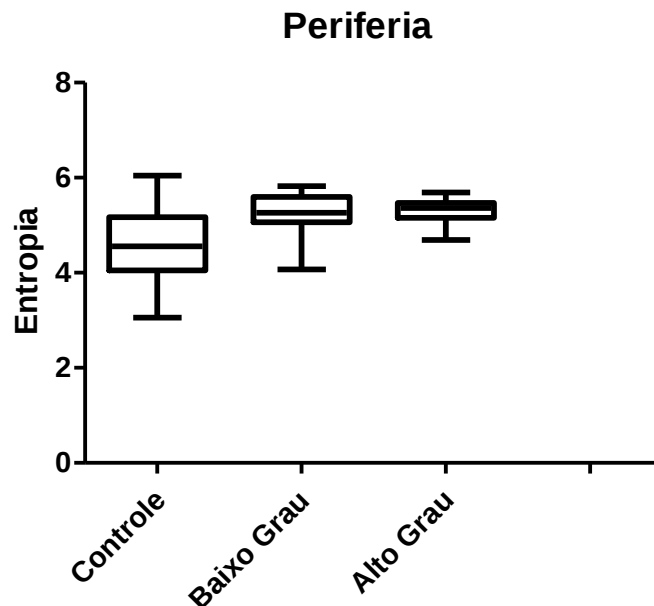
Amostra	Periferia		Centro	
	Kurt / Ent		Kurt / Ent	
Controle	39,84 ^a	4,62 ^a	67,95 ^a	5,53 ^a
Baixo Grau	30,13 ^a	5,26 ^b	27,80 ^b	5,71 ^a
Alto Grau	30,12 ^a	5,30 ^b	27,90 ^b	5,64 ^a

*Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as linhas da mesma coluna ($p < 0,01$).

131 Os carcinomas não diferem entre si, mas sim do tecido saudável. Na região central houve
132 aumento da densidade estromal segundo a *kurtosis* (Figura 3), e que também pode ser observado na
133 periferia, a partir da entropia (Figura 4).



134
135 **Figura 3.** Comparação entre grupo controle e os carcinomas de baixo e alto grau quanto a
136 localização central de acordo com os valores médio de *kurtosis*. Valor de $p < 0,01$.



137
138 **Figura 4.** Comparação entre grupo controle e os carcinomas de baixo e alto grau quanto a
139 localização em periferia do atributo entropia. Valor de $p < 0,01$.

140

141 **Discussão**

142 A análise do tecido conjuntivo pelo método PSR se mostrou eficaz na avaliação de processo
143 cicatricial (17), como em lesões malignas, utilizado para identificar fibras colágenas em carcinoma
144 prostático canino (38), e de carcinoma mamário de mulheres (39), mas para gatas não há citação
145 sobre esta utilização na análise estromal do parenquima mamário de gatas.

146 O processamento digital de imagem pode ser aplicado em diferentes tipos de imagem, desde
147 que a qualidade de captura seja mantida, permitindo que os atributos descritores, assim como sua
148 interpretação, variem de acordo com a análise a ser realizada (40). Graças à homogenicidade das
149 imagens obtidas pelas amostras do grupo controle, a escolha dos atributos extraídos teve como
150 referencia o tecido normal.

151 No grupo controle houve predominância de tons mais escuros, o que garantiu valores
152 discrepantes de moda, mediana, média, e desvio padrão, o que diminui a confiabilidade estatística
153 desses dados. Tais características fortaleceram a escolha do atributo *kurtosis* para quantificar as
154 fibras colágenas no carcinoma mamário das gatas pelo método PSR, o que aprimora a análise
155 estatística pela distribuição plana no teste T (41). Além disto, houve grande diferença entre os
156 valores médios de periferia e centro, o que o tornou adequado para analisar a densidade do colágeno
157 mamário das gatas. Outro fator importante, os valores desse descritor foram inversamente
158 proporcional aos valores apresentados pela entropia, o que dá mais confiabilidade estatística a
159 *kurtosis*. O fato de que todas as amostras manifestaram valores positivos, enquadra a análise de alta
160 distribuição, reforçando o bom desempenho estatístico (26).

161 Os atributos de textura são ideais para avaliar as bordas da imagem, sendo a entropia
162 indicada para o aprimoramento dos detalhes da periferia tumoral (29). Para as imagens avaliadas
163 neste trabalho, este descritor foi interpretado como desorganização das fibras, desta forma o menor
164 valor numérico representa a pouca dispersão das fibras colágenas, e consequentemente menor
165 densidade.

166 O ganho de fibras colágenas nos carcinomas mamários de gatas em relação ao tecido normal
167 foi notório, tanto na área central, identificado pelo atributo *kurtosis*, como na periferia segundo a
168 entropia, independente do seu grau de diferenciação. A eficácia da entropia para analisar a periferia
169 tumoral em comparação a *kurtosis* corrobora com a literatura (27).

170 Em relação à distribuição periférica dos carcinomas mamários analisados nesse trabalho, é
171 possível interpretar que as fibras colágenas estão em maior quantidade e em padrão mais organizado
172 em relação ao centro. Os grupos tumorais não diferem entre si, mas sim em relação ao tecido
173 normal. Assim, o aumento da densidade estromal periférica pode estar relacionado à agressividade,
174 a semelhança do que acontece em mulheres com câncer de mama (20,42).

175 A região central dos carcinomas mamários de gatas aqui avaliados também manifestou
176 aumento significativo de densidade estromal, o que pode ser justificado pela função estrutural (43)
177 destas fibras que se moldam de acordo com a necessidade do tecido glandular, de acordo com as
178 interações moleculares (44).

179 Com os resultados deste estudo é possível concluir que os atributos *kurtosis* e entropia,
180 extraídos das imagens dos cortes histológicos corados por PSR do tecido mamário de gatas foram
181 eficazes para estimar sobre a densidade estromal, respectivamente o centro e a periferia, e indicaram
182 que o aumento da densidade estromal dos carcinomas, independente da sua graduação, acontece em
183 ambas às regiões. Novos estudos são necessários, mas sugere-se que a semelhança da mulher, o
184 aumento da densidade do estroma mamário pode estar relacionado a agressividade do carcinoma
185 mamário nas gatas.

186

187 **Agradecimentos**

188 Ao Doutor Felipe Augusto Ruiz Sueiro, diretor do laboratório VetPat – Campinas, e a
189 Universidade de Marília (Unimar) por disponibilizar material de arquivo com qualidade adequada
190 para viabilizar este trabalho.

191 À colaboração da Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Uberlândia,
192 que aprimorou a qualidade dos nossos resultados.

193

194 **Referências**

- 195 1. Amorim F V., Souza HJM, Ferreira AMR, Fonseca ABM. Clinical, cytological and
196 histopathological evaluation of mammary masses in cats from Rio de Janeiro, Brazil. J Feline
197 Med Surg. 2006;8(6):379–88.
- 198 2. Misdorp W. Tumors of the Mammary Gland. In: Tumors in Domestic Animals [Internet].
199 Ames, Iowa, USA: Iowa State Press; 2008 [cited 2018 May 14]. p. 575–606. Available from:
200 <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470376928.ch12>
- 201 3. Hughes K, Dobson JM. Prognostic histopathological and molecular markers in feline
202 mammary neoplasia. Vet J [Internet]. 2012;194(1):19–26. Available from:
203 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.008>
- 204 4. TAMAMOTO T, OHNO K, GOTO-KOSHINO Y, TSUJIMOTO H. Serum Amyloid A
205 Promotes Invasion of Feline Mammary Carcinoma Cells. J Vet Med Sci [Internet].
206 2014;76(8):1183–8. Available from: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/jvms/14-0108?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>
- 208 5. Marques CS, Soares M, Santos A, Correia J, Ferreira F. Serum SDF-1 levels are a reliable
209 diagnostic marker of feline mammary carcinoma, discriminating HER2-overexpressing
210 tumors from other subtypes. Oncotarget. 2017;8(62):105775–89.
- 211 6. C.S. M, A.R. S, A. G, J. C, F. F. CXCR4 and its ligand CXCL12 display opposite expression
212 profiles in feline mammary metastatic disease, with the exception of HER2-overexpressing
213 tumors. BMC Cancer [Internet]. 2018;18(1). Available from:
214 <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L62303055>
215 0
- 216 7. Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. Feline mammary tumours

- 217 in comparative oncology. *J Dairy Res.* 2005;72(SPEC. ISS.):98–106.
- 218 8. Cannon CM. *Cats, Cancer and Comparative Oncology.* 2015;111–26.
- 219 9. Cassali G, Bonolo de Campos C, Cavalheiro BERTAGNOLLI A, Lima A, Eunice
220 LAVALLE G, Damasceno K, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of
221 feline mammary tumors. Vol. 55, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal*
222 *Science.* 2018. 1–17 p.
- 223 10. Seixas F, Palmeira C, Pires MA, Bento MJ, Lopes C. Grade is an independent prognostic
224 factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Vet J*
225 [Internet]. 2011;187(1):65–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.030>
- 226 11. Maria R De, Olivero M, Iussich S, Nakaichi M, Murata T, Biolatti B, et al. Spontaneous
227 Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human
228 Breast Cancer. *Cancer Res.* 2005;65(3):907–12.
- 229 12. Matos AJF, Baptista CS, Gärtner MF, Rutteman GR. Prognostic studies of canine and feline
230 mammary tumours: The need for standardized procedures. *Vet J* [Internet]. 2012;193(1):24–
231 31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.019>
- 232 13. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology,
233 Prevention, and Screening. In: Lakshmanaswamy RBT-P in MB and TS, editor. *Approaches*
234 *to Understanding Breast Cancer* [Internet]. Academic Press; 2017. p. 1–32. Available from:
235 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117317301126>
- 236 14. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Knittel JG, Yan L, Rueden CT, et al. Collagen
237 density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med.* 2008;6:1–15.
- 238 15. Habel LA, Dignam JJ, Land SR, Salane M, Capra AM, Julian TB. Mammographic Density
239 and Breast Cancer After Ductal Carcinoma In Situ. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2004
240 Oct 6;96(19):1467–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djh260>
- 241 16. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour
242 microenvironment. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2015.

243 p. 669–82.

- 244 17. Bauman TM, Nicholson TM, Abler LL, Eliceiri KW, Huang W, Vezina CM, et al.
 245 Characterization of Fibrillar Collagens and Extracellular Matrix of Glandular Benign
 246 Prostatic Hyperplasia Nodules. PLoS One [Internet]. 2014 Oct 2;9(10):e109102. Available
 247 from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109102>
- 248 18. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of
 249 Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer
 250 working Group. J Natl Cancer Inst. 2011;103(22):1656–64.
- 251 19. Kuhl CK. Review article MRI of breast tumors. 2000;58:46–58.
- 252 20. Matsubayashi R, Matsuo Y, Edakuni G, Satoh T, Tokunaga O, Kudo S. Breast Masses with
 253 Peripheral Rim Enhancement on Dynamic Contrast-enhanced MR Images: Correlation of
 254 MR Findings with Histologic Features and Expression of Growth Factors. Radiology
 255 [Internet]. 2000 Dec 1;217(3):841–8. Available from:
 256 <https://doi.org/10.1148/radiology.217.3.r00dc07841>
- 257 21. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour
 258 hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. Nature [Internet].
 259 2011 Jul 13;475:226. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature10169>
- 260 22. CHOUAIB S, MESSAI Y, COUVE S, ESCUDIER B, HASMIM M, NOMAN M. Hypoxia
 261 Promotes Tumor Growth in Linking Angiogenesis to Immune Escape. Front Immunol
 262 [Internet]. 2012;3:21. Available from:
 263 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00021>
- 264 23. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.
 265 Nat Med [Internet]. 2013 Nov 7;19:1423. Available from: <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- 266 24. Filho OM, Neto HV. Processamento Digital de Imagens [Internet]. Vol. 21/03, Revista
 267 Brasileira de Geofísica. 1999. 331 p. Available from:
 268 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

- 261X1998000100035&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
25. Maini R, Aggarwal H. A Comprehensive Review of Image Enhancement Techniques. CoRR [Internet]. 2010;abs/1003.4. Available from: <http://arxiv.org/abs/1003.4053>
 26. Hutli E, Nedeljkovic M, Bonyár A. Dynamic behaviour of cavitation clouds: visualization and statistical analysis. J Brazilian Soc Mech Sci Eng [Internet]. 2019;41(7):281. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40430-019-1777-9>
 27. Rockinger M, Jondeau E. Entropy densities with an application to autoregressive conditional skewness and kurtosis. J Econom [Internet]. 2002;106(1):119–42. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304407601000926>
 28. Jafari-Khouzani K, Soltanian-Zadeh H. Multiwavelet grading of pathological images of prostate. IEEE Trans Biomed Eng. 2003;50(6):697–704.
 29. Zhang M, Zhang Y. The application of adaptive enhancement algorithm based on gray entropy in mammary gland CR image. In: 2012 2nd International Conference on Consumer Electronics, Communications and Networks (CECNet). 2012. p. 2937–40.
 30. Payan-Carreira R, Martins-Bessa AC. Ultrasonographic assessment of the feline mammary gland. J Feline Med Surg [Internet]. 2008 Oct 1;10(5):466–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.03.006>
 31. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology. 1991;19:403–10.
 32. Castagnaro M, De Maria R, Bozzetta E, Ru G, Casalone C, Biolatti B, et al. Ki-67 index as indicator of the post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. Res Vet Sci. 1998;65(3):223–6.
 33. Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, Maria R De, Biolatti B, Caramelli M, et al. Tumour Grading and the One-year Post-surgical Prognosis in Feline Mammary Carcinomas. 1998;119:263–75.

- 295 34. Petric M, Martinez S, Acevedo F, Oddo D, Artigas R, Camus M, et al. Correlation between
 296 Ki67 and histological grade in breast cancer patients treated with preoperative chemotherapy.
 297 Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(23):10277–80.
- 298 35. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, Instrumentation C. NIH Image to ImageJ: 25
 299 years of Image Analysis. 2017;9(7):671–5.
- 300 36. Kim H. Statistical notes for clinical researchers: assessing normal distribution (2) using
 301 skewness and kurtosis. 2013;7658(2):52–4.
- 302 37. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein I. Textural Features for Image Classification. IEEE
 303 Trans Syst Man Cybern. 1973;SMC-3(6):610–21.
- 304 38. Calderón LGR, Kobayashi PE, Vasconcelos RO, Fonseca-Alves CE, Laufer-Amorim R.
 305 Characterization of Collagen Fibers (I, III, IV) and Elastin of Normal and Neoplastic Canine
 306 Prostatic Tissues. Vet Sci [Internet]. 2019 Mar 2;6(1):22. Available from:
 307 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30832371>
- 308 39. Jerome NP, Boulton JKR, Orton MR, Arcy JA, Nerurkar A, Leach MO, et al. Characterisation
 309 of fibrosis in chemically-induced rat mammary carcinomas using multi-modal endogenous
 310 contrast MRI on a 1.5T clinical platform. 2018;1642–53.
- 311 40. Pratt WK. Processing Digital Image Processing [Internet]. Vol. 5, Image Rochester NY.
 312 2001. 0–471 p. Available from: <http://www.citeulike.org/group/278/article/318720>
- 313 41. Kollo T. Multivariate skewness and kurtosis measures with an application in ICA. J Multivar
 314 Anal [Internet]. 2008;99(10):2328–38. Available from:
 315 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047259X08000626>
- 316 42. Mercado CL, Naidrich SA, Hamele-Bena D, Fineberg SA, Buchbinder SS.
 317 Pseudoangiomatous Stromal Hyperplasia of the Breast: Sonographic Features with
 318 Histopathologic Correlation. Breast J [Internet]. 2004 Sep 1;10(5):427–32. Available from:
 319 <https://doi.org/10.1111/j.1075-122X.2004.21373.x>
- 320 43. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. Adv

- 321 Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;97:4–27. Available from:
322 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X15002574>
- 323 44. Wang K, Wu F, Seo BR, Fischbach C, Chen W, Hsu L, et al. Breast cancer cells alter the
324 dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. *Matrix Biol* [Internet]. 2017;60–
325 61:86–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.001>