

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

Fernanda Freitas Miranda

**MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DE INVASÃO E FOCOS METASTÁTICOS
CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA
CANINA E SUA CORRELAÇÃO COM A SOBREVIDA ESPECÍFICA**

Belo Horizonte
2024

Fernanda Freitas Miranda

**MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DE INVASÃO E FOCOS METASTÁTICOS
CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA
CANINA E SUA CORRELAÇÃO COM A SOBREVIVÊNCIA ESPECÍFICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG como parte do requisito para a obtenção parcial de mestre em patologia - Área de concentração em patologia investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas

Cassali Coorientadora: Dra. Michele

Angela Rodrigues

Belo Horizonte
2024

043

Miranda, Fernanda Freitas.

Mensuração das áreas de invasão nos carcinomas em tumores mistos da glândula mamária canina e sua correlação com a sobrevida específica [manuscrito] / Fernanda Freitas Miranda. – 2024.

46 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali. Coorientadora: Dra. Michele Angela Rodrigues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Neoplasias Mamárias Animais. 3. Metástase Neoplásica. 4. Linfonodos. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Rodrigues, Michele Angela. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis – CRB 6 – 2680



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA
UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO N° 479 DE FERNANDA FREITAS
MIRANDA

Realizou-se, no dia 04 de abril de 2024, às 14 horas, no formato on- line, Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada “**Mensuração das Áreas de Invasão nos Carcinomas em Tumores Mistos da Glândula Mamária Canina e sua Correlação com a Sobrevida Específica**”, apresentada por *Fernanda Freitas Miranda* (número de registro 2022659753), graduada no curso de Medicina Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: *Profa. Dra. Angelica Cavalheiro Bertagnolli*, IPVDF/RS; *Profa. Dra. Fernanda Camargo Nunes*, Centro Universitário – UNIFEC/RS; *Pós-Doc. Dra. Michele Ângela Rodrigues* – CDTN/UFMG – **COORDINADORA**; *Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali* – ICB/UFMG– **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Dissertação:

APROVADA (
 REPROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 04 de abril de 2024.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.**



Documento assinado eletronicamente por **Geovanni Dantas Cassali, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2024, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Angela Rodrigues, Usuária Externa**, em 05/04/2024, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Camargo Nunes, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Cavaleiro Bertagnolli Rodrigues, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3160129** e o código CRC **F61BD714**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA
UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“MENSURAÇÃO DAS ÁREAS DE INVASÃO NOS CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA E SUA CORRELAÇÃO COM A SOBREVIDA ESPECÍFICA”

FERNANDA FREITAS MIRANDA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de **Pós-Graduação em Patologia da UFMG**, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 04 de abril de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Angelica Cavalheiro Bertagnolli, IPVDF/RS
Profa. Dra. Fernanda Camargo Nunes, Centro Universitário – UNIFEC/RS *Pós-Doc.*
Dra. Michele Ângela Rodrigues – CDTN/UFMG - **COORIENTADORA** *Prof. Dr.*
Geovanni Dantas Cassali – ICB/UFMG - **ORIENTADOR**

Belo Horizonte, 04 de abril de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Geovanni Dantas Cassali, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2024, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Angela Rodrigues, Usuária Externa**, em 05/04/2024, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Camargo Nunes, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Cavalheiro Bertagnolli Rodrigues, Usuário Externo**, em 09/04/2024, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3160130** e o código CRC **684568CE**.

*Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha mãe e meu pai, que
nunca
deixaram de apoiar meu sonho, Amo vocês pela eternidade.*

*Aos meus queridos irmão Nat e Felipe que sempre estiveram ao meu lado,
gratidão
pelo amor de vocês. Aos meus cães que já partiram Sofia
e Negão, que me ensinaram o amor.*

AGRADECIMENTOS

Eu expresso minha gratidão à minha Rainha Universal e a Deus. O amor de vocês aquece e ilumina minha alma. Quando me vi à beira de desistir dos meus sonhos, foi a força universal que me proporcionou a energia necessária para prosseguir.

Aos meus amados pais, Leonardo e Vitória, que sempre me sustentaram com amor e apoio, abdicando de seus próprios sonhos para realizar os nossos. Vocês sempre acreditaram em mim, e por isso, expresso minha imensa gratidão por tudo que fizeram por mim. Amo vocês profundamente...

Aos meus queridos irmãos, Nat e Felipe, por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem incondicionalmente. Vocês sempre lembram do quanto sonhei em ser Médica Veterinária e cuidar dos animais desde pequena. Amo vocês...

À toda minha família, mesmo na minha ausência, vocês acreditaram em mim e me apoiaram em cada passo do caminho. Amo vocês.

Ao meu orientador, Geovanni, expresso profunda gratidão por mais uma vez abrir as portas do LPC-UFMG para mim. Agradeço por todas as orientações preciosas que me proporcionou, por estar presente em todos os momentos importantes e pelas valiosas lições ao longo desse caminho. Sou grata pelos conselhos sábios e pelo incentivo constante que me ofereceu.

À minha coorientadora Michele, expresso minha sincera gratidão por sua solicitude e gentileza constantes. Agradeço pelos conselhos valiosos e pelas lições que compartilhou comigo em todos os momentos. Obrigada

por compartilhar seu conhecimento e por sua contribuição significativa para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A família LPC, Fernanda Rezende, Lize Borges, Evelyn Oliveira, Ana Paula, Marina Reys, Camila Xavier, Mayra Flecher, Isabella Moreira, Laiz Damasceno, Marisa Salvi e Samella, toda gratidão pela amizade sincera e por tornarem nossos dias mais leves.

Jamais esquecerei das risadas compartilhadas no meio do caos. Saibam que o apoio e a união de vocês foram cruciais durante toda a minha jornada. Sou eternamente grata por vocês terem contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal. Jamais esquecerei de vocês.

Querida amiga Fernanda Rezende, expresso minha profunda gratidão por sua parceria e incentivo. Que nossa amizade continue sendo tão bonita e alegre como sempre foi, refletindo quem somos. Sou imensamente grata por tê-la conhecido e por desfrutar da sua linda amizade.

Agradeço a todos com quem convivi durante minha iniciação científica no LPC: Karine, Diego, Cecília, Lidiane, Marina, Fernanda Camargo, Tatiany, Istéfani, Stefane, Rodrigo Horta, Conrado, Mirian, Isabel, Emerson, Carol, Maria, Bruna de Cássia, Ana Maciel, Gabriel e Paula. Aprendi um pouco com cada um de vocês, e os conhecimentos compartilhados serão eternamente parte de mim. Sou grata por terem contribuído para minha evolução pessoal e profissional.

Aos meus amigos de BH: Anna Raphaela, Gustavo, Raquel Gontijo, Vanessa Vaz, Patrícia Lages, Bianca amarantes, Mariana Lages, Nathalia, Andréia agradeço por compartilhar os dias com vocês e por tornarem tudo mais leve.

Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG e Laboratório de Patologia Veterinária – UVV e o Hospital Veterinário/UFMG por cederem amostras e disponibilizarem o acervo de dados clínicos e patológicos.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFMG, por ter permitido todo o trabalho possível.

Gratidão

*O Amor não expirará. Nunca houve o instante em que ficou sem
vida no mundo.... Ser lembrado é quase ser
amado, e ser amado é o paraíso...*

Emily Dickinson

RESUMO

Os carcinomas em tumores mistos (CMT) são comumente diagnosticados nas glândulas mamárias das cadelas, representando 44% dos casos. No entanto, devido à falta de áreas invasoras suficientes, nem sempre é viável realizar a gradação histológica. O objetivo deste trabalho foi mensurar as áreas e quantificar os focos de invasão no estroma dos carcinomas em tumores mistos e compreender melhor seu comportamento biológico. Foram avaliados 45 casos de carcinoma em tumor misto divididos em dois grupos, com metástase e sem metástase e foram mensurados o tamanho, perímetro, comprimento e contagem do número de áreas carcinomatosas invasoras. Os dados clínico patológicos foram obtidos das fichas de requisição e para a sobrevida houve acompanhamento das cadelas. Os casos com diagnóstico de carcinoma em tumor misto com metástase apresentaram maior número de focos ($p=0,003$) e maior tamanho de áreas de invasão em relação aos casos sem metástase ($p=0,006$). Além disso, foi possível observar que as pacientes com áreas de invasão maiores que 3mm^2 apresentaram menor tempo de sobrevida. Não foi verificada relação entre perímetro, comprimento das áreas invasoras e a expressão de Ki67, RE, RP, COX-2 e HER-2, e com o imunofenótipo. Foi demonstrado que o número de focos e tamanho das áreas de invasão estão associados ao status do linfonodo regional e que a histomorfometria é uma ferramenta importante na rotina da patologia veterinária podendo fornecer informações importantes sobre o comportamento biológico do carcinoma em tumor misto.

Palavras-chaves: glândula mamária, área de invasão, linfonodo, metástase.

ABSTRACT

Carcinomas in mixed tumors (CMT) are commonly diagnosed in the mammary glands of female dogs, representing 44 % of cases. However, due to the lack of sufficient invasive areas, histological grading is not always viable. This study aimed to measure the areas and quantify the foci of invasion in the stroma of mixed tumor carcinomas and to better understand their biological behavior. Forty-five cases of carcinomas with mixed tumors were evaluated and divided into two groups (with and without metastasis), and the size, perimeter, length, and number of invasive carcinomatous areas were measured. Clinicopathological data were obtained from the requisition forms and the dogs were monitored for survival. Cases diagnosed with carcinoma in mixed tumors with metastasis presented a greater number of foci ($p=0.003$) and larger invasion areas than cases without metastasis ($p=0.006$). Furthermore, patients with invasion areas $> 3 \text{ mm}^2$ had shorter survival rates. No relationship was found between the perimeter, length of invasive areas, expression of Ki67, ER, PR, COX-2, and HER-2, and the immunophenotype. It was demonstrated that the number of foci and size of areas of invasion are associated with the status of the regional lymph node, and that histomorphometry is an important tool in veterinary pathology routine, providing valuable information about the biological behavior of carcinomas in mixed tumors.

Keywords: mammary gland, area of invasion, lymph node, metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto com metástase.....26

Figura 2-Avaliação do tamanho, perímetro e número dos focos de invasão no carcinoma em tumor misto sem metástase (CMT) e no carcinoma em tumor misto com metástase (CMTM). **a** Comparação entre o número dos focos de invasão no CMT e no CMTM (Teste T não pareado). **b** Comparação entre o tamanho dos focos de invasão no CMT e no CMTM (Kolmogorov-Smirnov). **c** Comparação entre o perímetro dos focos de invasão no CMT e no carcinoma em tumor com metástase (Kolmogorov-Smirnov). **d** Correlação entre a presença de metástase nos carcinomas (0 foi atribuído para o CMT e 1 para o CMTM). **e** Associação entre o número de focos de invasão e a presença de metástase nos carcinomas. **f** Associação entre o tamanho dos focos de invasão e a presença de metástase nos carcinomas.....28

Figura 3. Curva de sobrevida específica derivada da análise de Kaplan-Meier das pacientes diagnosticadas com carcinoma: **(a)** o grupo CMTM alcançou a mediana no 1015° dia e o grupo CMT foi no 502° dia. **(b)** Pacientes com tamanhos de áreas de invasão $< 2\text{mm}^2$ alcançaram a mediana no 1052° dia e as que apresentaram tamanhos de áreas de invasão $> 2\text{mm}^2$ a mediana no 703° dia. **(c)** Pacientes que o número de focos de invasão foi > 14 , a mediana alcançada foi no 245° dia, e as que os números de focos de invasão foi < 14 alcançou mediana no 1015° dia.....30

LISTAS DE ABREVIATURAS

CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CTMM/CMTM: Carcinoma em tumor misto com metástase ganglionar/Carcinoma in mixed tumor with lymph node metastasis

CTM/CMT: Carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar/Carcinoma in mixed tumor without lymph node metastasis

CETEA/UFMG – Comitê de Ética para experimentação Animal/Universidade Federal de Minas Gerais.

Cox-2 –Ciclooxigenase 2

ErbB2 (HER2): Receptor para fator de crescimento

epidérmico 2 EGFR - Receptor da fator de

crescimento epidermal humano tipo 1 H&E:

Hematoxilina e Eosina

LPC: Laboratório de Patologia

Comparada MEC: Matriz

extracelular

p63 – Proteína codificada pelo gene TP63 com papel no desenvolvimento epidérmico

Δ Np63 – Isoforma (sem a porção amino-terminal)

da proteína p63 RE – Receptor de estrógeno

RP- Receptor de progesterona

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais.

Apoio financeiro: CNPq e CAPES.



UF *m* G



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Incidência do câncer de mama em cadelas	16
2.2	Tumores mistos	17
2.3	Carcinoma em tumor misto	18
2.4	Progressão tumoral: áreas <i>in situ</i> e invasoras	19
2.5	Gradação histológica dos carcinomas	21
3	HIPÓTESE	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	Aspectos Éticos	22
4.2	Amostras	22
4.3	Histologia	23
4.4	Histomorfometria das áreas de invasão	23
4.5	Imuno-histoquímica	24
4.6	Análise Estatística	25
4.7	Sobrevida Específica	26
5	RESULTADOS	26
5.1	Caracterização das amostras	26
5.2	Avaliação do tamanho, perímetro e número dos focos de invasão	27
5.3	Avaliação da influência da presença de metástase regional, tamanho e número dos focos de invasão sobre a sobrevida específica	30
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÕES FINAIS	35
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
9	REFERÊNCIAS	36
10	ANEXO 1- APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA-UFMG	41
11	ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO	41

1 INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, houve um despertar dos pesquisadores em relação ao estudo das neoplasias mamárias em cadelas, principalmente pela elevada incidência de tumores malignos na mama. De acordo com um estudo epidemiológico envolvendo 1539 casos, a taxa de malignidade foi de 85%, enquanto as lesões benignas corresponderam a 13%. O tipo histológico mais prevalente foi o carcinoma em tumor misto, que ocorreu em 44% das neoplasias analisadas (Nunes et al., 2019). Na maioria dos casos, quando as neoplasias mamárias são diagnosticadas tardiamente, a doença apresenta prognóstico desfavorável devido à presença de tumores maiores que 5,0cm de diâmetro, apresentando crescimento rápido, áreas de ulceração, estadio avançado e caráter infiltrativo com metástase à distância (Cavalcanti & Cassali, 2006; Ferreira *et al.*, 2009; Toríbio, 2012).

No carcinoma em tumor misto, observa-se histologicamente proliferação de células epiteliais malignas e células mesenquimais diferenciadas que formam cartilagem, osso e são combinadas com matriz mixoide. Em termos clínicos, geralmente apresenta um prognóstico favorável em comparação com outras neoplasias agressivas, como carcinoma micropapilar, carcinoma sólido e pleomórfico (Cassali et al., 2020). Durante a progressão do tumor misto para carcinoma em tumor misto, são observadas áreas de proliferação carcinomatosa *in situ*, seguidas por áreas invasoras (Dasmaceno, 2012). No entanto, devido à complexidade morfológica desse tipo histológico, muitas vezes não há áreas invasoras suficientes para graduar o tumor histologicamente.

Portanto, o estudo do comportamento biológico e da evolução dos carcinomas em tumores mistos é fundamental devido as suas heterogeneidades histológicas e molecular (Misdorp et al., 1973; Cassali et al., 2012). Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo mensurar o tamanho, perímetro, comprimento e contagem do número de áreas

carcinomatosas invasoras no estroma e correlacionar com a ocorrência de metástases regionais, bem como com sobrevida dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Incidência do câncer de mama em cadelas

Nas cadelas as neoplasias mamárias são as mais frequentes, sendo cerca de 50% a 90% malignas e, o motivo do óbito das pacientes é a progressão da doença e a metastização à distância (Sorenmo et al., 2013; Nunes. et al., 2018). A incidência crescente de neoplasias mamárias é multifatorial, influenciada por diversos fatores, tais como aspectos hormonais, genéticos, nutricionais e ambientais, além do aumento na expectativa de vida das cadelas (LANA et al., 2007; CLEARY et al., 2010).

De acordo com Cassali e colaboradores (2012) os tumores mistos são histologicamente semelhantes às neoplasias localizadas nas glândulas salivares da espécie humana e são denominados adenomas pleomórficos, podendo progredir para carcinomas ex-adenomas pleomórficos. Com relação à faixa etária das cadelas acometidas pelo câncer de mama, a doença ocorre principalmente nas cadelas com idade mais avançada, em média entre os 9 a 11 anos de idade e é rara em animais com menos de 5 anos de idade (Perez- Alenza, 2000; Sorenmo, 2013).

Um estudo realizado por Nunes e colaboradores (2019) com 904 tumores mistos, demonstrou que o carcinoma em tumor misto é o tipo mais frequente, correspondendo a um total de 75% dos casos pesquisados, seguido pelo tumor misto benigno com 18% casos, e, em terceiro lugar, pelo carcinosarcoma com 7% dos casos. As variações nos tipos histológicos podem conferir diferenças no prognóstico e no correto tratamento dessas neoplasias (Cassali et al, 2020). Cadelas que apresentaram diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto apresentaram uma sobrevida maior, comparada a pacientes com

carcinossarcoma que demonstraram uma sobrevida curta. Entretanto, cadelas com carcinoma em tumor misto com áreas micropapilares e áreas sólidas, apresentaram na avaliação, um tempo de sobrevida menor (Nunes et al., 2019). A avaliação dos fatores prognósticos como estadiamento clínico, idade, tipo e grau histológico, tamanho do tumor, marcadores moleculares e metástase regional e à distância podem fornecer importantes informações sobre o comportamento biológico da doença e definir estratégias terapêuticas para os pacientes (Sorenmo, 2013; Man et al 2020; Cassali et al., 2020).

2.2 Tumores mistos

Tumores mistos são definidos pela presença histológica de dois ou mais tipos celulares, compostos por células epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais, envolvidos em um estroma abundante, que pode ser composto por matriz mixoide, condroide ou óssea (Cassali et al., 2020; Saad et al, 2018).

Nas cadelas, os tumores mistos são frequentes e geralmente estão associados a um bom prognóstico. Semelhanças morfológicas foram observadas entre tumor misto benigno, carcinoma em tumor misto, carcinossarcoma das glândulas mamárias nas cadelas e os adenomas pleomórficos e carcinomas ex adenoma pleomórficos da glândula salivar humana, visto que eles são derivados de glândulas exócrinas (Cassali, 2007).

Em 1874, o termo tumor misto foi descrito por Minssen, no qual a neoplasia tinha origem epitelial e estromal. Posteriormente, Eneroth designou outros nomes para tumores mistos como ‘adenoma complexo’, ‘adenoma pleomórfico e adenocarcinoma’, ‘tumor epitelial misto’ e outros (Saad et al., 2019). Na espécie humana, casos de tumores mistos foram relatados em vários órgãos: glândula salivar, útero, glândula mamária, pulmão, vesícula biliar e outros. Nas cadelas, foi diagnosticado

principalmente nas glândulas mamárias, tireoide, pulmão, pálpebra e glândula salivar. Raramente, os tumores mistos nas gatas foram relatados nas glândulas mamárias, pâncreas e glândulas salivares (Saad et al, 2019).

2.3 Carcinoma em tumor misto

O carcinoma em tumor misto se diferencia do tumor misto benigno pela presença de células epiteliais malignas. Além disso, esse tipo de carcinoma é caracterizado por outros componentes mesenquimais benignos formando cartilagem, osso, tecido adiposo associado eventualmente a matriz mixóide (ERDÉLYI et al., 2005; Cassali., 2012).

O tecido cartilaginoso apresenta condrócitos e condroblastos com pouca alteração morfológica, com graus de diferenciação baixo a moderado. O tecido ósseo, quando presente, é formado por osteoclastos que produzem matriz osteóide e osso mineralizado.

As células mioepiteliais podem exibir uma aparência fusiforme ou estrelada, e essas células estão envoltas por uma matriz mixóide (Auler et al., 2011; Cassali et al., 2020).

O tumor misto benigno apresenta baixo índice mitótico e baixa atipia celular. Por fim, o carcinosarcoma se diferencia dos outros dois tipos histológicos por ser caracterizado pela presença de componentes epiteliais e mesenquimais malignos (Misdorp., 1999). As células mioepiteliais podem exibir uma aparência fusiforme ou estrelada, e essas células estão envoltas por uma matriz extracelular abundante (matriz mixóide) .

O carcinoma em tumor misto da cadela apresenta elementos morfológicos similares ao carcinoma metaplásico da mama humana (Ribeiro *et al.*, 2010). Entretanto, nas mulheres o carcinoma metaplásico é raro e com prognóstico desfavorável, sendo as metástases à distância comuns (Luini *et al.*, 2007)

Segundo Misdorp e colaboradores (1999), o início do carcinoma em tumor misto ocorre pela transformação maligna das células epiteliais dos tumores misto benignos. No tumor misto observam-se áreas de proliferação carcinomatosas *in situ* e invasoras. A área *in situ* compreende a proliferação epitelial maligna ocupando o lúmen e camada de células mioepiteliais e a membrana basal íntegras. Em relação às áreas invasoras, o padrão é a perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal, com infiltração de células epiteliais no estroma, podendo haver substituição da lesão benigna pré-existente (Cassali *et al.*, 2020).

As áreas de invasão dos carcinomas mamários são graduadas de acordo com sistema de Nottingham (modificado por Elston e Ellis 1991). Entretanto, nos carcinomas em tumores mistos essa classificação nem sempre é possível, por não haver 10 áreas invasoras em campos de maior aumento (HPF-High-Power-Field) para avaliar. Um estudo realizado por Nunes (2019), demonstrou que dos 682 casos diagnosticados como carcinomas em tumores mistos, apenas 12% (82/682) foram graduados.

A avaliação dos focos de invasão, associados às metástases regionais e à distância, permite prever o comportamento biológico do tumor e o prognóstico do paciente (Hoda et al, 1999; Cassali et al, 2020). Na medicina veterinária, assim como na medicina humana, a presença de metástases regionais e à distância estão associadas à menor tempo de sobrevida, sendo um dos principais fatores prognósticos (Carvalho et al., 2016; Cassali et al., 2020).

2.4 Progressão tumoral: áreas *in situ* e invasoras

O estudo da progressão tumoral em neoplasias mamárias caninas teve início em 1970, quando surgiu a hipótese de que os tumores mistos tivessem tempo suficiente para crescer e sofrer transformação maligna

(Misdorp.,1999). Posteriormente, alguns autores conseguiram elucidar alguns mecanismos envolvidos na transformação maligna desses tumores mistos benignos, observando alterações nas proteínas presentes no microambiente tumoral, como a perda da expressão de p63, E-caderina, γ Np63, β -catenina e EGFR (Genelhu et al., 2007; Bertagnolli et al., 2011). Além disso, estudos revelaram que a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) pode estar associada a um evento precoce na carcinogênese dos tumores mistos, decorrente de mudanças na expressão dessa molécula e iniciando o mecanismo de invasão celular (Bertagnolli et al., 2011).

Em 2007, Genelhu et al. conduziu um estudo no qual observou uma diminuição da expressão de p63 nas células mioepiteliais em carcinomas em tumores mistos, sugerindo a ausência dessas células nessas áreas. A falta de células mioepiteliais ou a perda de integridade da camada basal/mioepitelial é considerada um dos pré-requisitos para a invasão tumoral e a formação de metástases (Cassali et al., 2020). No entanto, são necessários mais estudos para compreender e elucidar os mecanismos que levam à ruptura da camada basal e a invasão no estroma.

Em 2012, Damasceno e colaboradores realizaram a avaliação do versican, um proteoglicano produzido por tecidos maduros (células estromais) como músculo liso, cartilagem e pele, que é um componente da matriz extracelular (MEC). A MEC desempenha um papel crucial ao criar um microambiente propício para a migração das células neoplásicas. As células neoplásicas, ao passarem por alterações, modificam o estroma, resultando na perda da expressão das moléculas de adesão e na indução da degradação e migração através do componente extracelular. Nesse estudo, foi analisada a expressão do proteoglicano nas áreas *in situ* e invasoras do carcinoma em tumor misto, juntamente com a avaliação de outros fatores prognósticos e da sobrevida global. Os estudos sugeriram que a expressão do versican difere significativamente entre as áreas *in situ* e as áreas invasoras, indicando uma relação dessa molécula com o desenvolvimento e a progressão tumoral. No entanto, os estudos também

indicaram que isoladamente o proteoglicano não era um fator prognóstico independente.

2.5 Graduação histológica dos carcinomas

Em 1957 foi criado o primeiro sistema de graduação utilizado para os carcinomas mamários nas mulheres proposto por Bloom & Richardson, posteriormente modificado por Elston e Ellis (1991). A graduação histológica dos carcinomas mamários só é realizada nas áreas invasoras, estes autores introduziram a importância do campo microscópico na avaliação do índice mitótico, e tanto nas mulheres quanto nas cadelas tem sido usado para associar a aspectos clinicopatológicos e agressividade (Cassali, 2023). Avalia-se a formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses. A contagem de mitoses em 10 campos é realizada considerando a área do microscópio em campos em maior aumento (HPF-High-power field) e deve ser realizada na periferia do tumor onde a proliferação celular é maior, evitando áreas de necrose, inflamação, sendo atribuído um escore de pontos de 1 a 3. Em relação a formação tubular, a avaliação ocorre também na determinação dos escores: escore 1: quando mais de 75 % da área tumoral for composta de túbulos; Escore 2: tumores exibindo entre 10 a 75% de túbulos; Escore 3: túbulos ocupando 10 % ou menos da área do tumor. O pleomorfismo nuclear é analisado o tamanho e forma dos núcleos das células epiteliais; Escore 1: células apresentando baixo pleomorfismo; Escore 2: moderado pleomorfismo; Escore 3: células apresentando alto pleomorfismo. Assim, somando os escores, e valores entre 3 a 5, 6 a 7 e 8 a 9 pontos, a neoplasia recebe a graduação I, II ou III.

Um estudo realizado com neoplasias mamárias caninas, ao longo de dois anos aplicou o método de graduação de Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis (1991), acompanhando pacientes e correlacionando o grau histológico com metástase regional, sobrevida e prognóstico. Os resultados desse estudo confirmaram que esse sistema de graduação foi considerado um fator prognóstico válido e pode ser aplicado com sucesso na medicina veterinária (Karayannpoulou et al., 2005). No entanto, a aplicação da

gradação histológica em tumores mistos, que apresentam uma variedade de componentes epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais, torna-se impraticável devido à sua heterogeneidade e complexidade (Cassali et al., 2020).

3 HIPÓTESE

O tamanho e o número de focos de invasão no carcinoma em tumor misto têm correlação com a sobrevida das pacientes.

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar as áreas de invasão no estroma do carcinoma em tumor misto e correlacionar estes dados com a sobrevida geral específica das pacientes.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o estudo morfométrico das áreas de invasão nos carcinomas em tumores mistos.
- Quantificar as áreas de invasão nos carcinomas em tumores mistos.
- Correlacionar o tamanho e o número das áreas de invasão nos carcinomas em tumores mistos com a sobrevida das pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O trabalho foi realizado conforme os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal- CETEA da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo CEUA: 333/2023.

4.2 Amostras

Foi realizada uma revisão retrospectiva, independente da raça ou idade, dos dados clínicos e patológicos de 45 casos de carcinomas em tumores mistos da glândula mamária canina e seus respectivos linfonodos regionais, distribuídos da seguinte forma: 25 casos sem metástase (CMT) e 19 casos com metástase (CMTM). As amostras foram provenientes de dois laboratórios: Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG e Laboratório de Patologia Veterinária - UVV. Maioria das lesões mamárias foram obtidas a partir de cadelas que passaram por exérese cirúrgica no Hospital da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (HV- UFMG) no período de 2010 a 2023, cujo material foi encaminhado pelos cirurgiões para diagnóstico histopatológico no Laboratório de Patologia Comparada - ICB/UFMG.

4.2 Histologia

Secções histológicas de 4µm foram obtidas dos fragmentos mamários fixados em formol neutro tamponado a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. Os tumores primários foram avaliados por três patologistas conforme as características celulares, arranjo celular, presença de células epiteliais, mioepiteliais e células mesenquimais com cartilagem e/ou formação óssea, ou com tecido mixóide fibroso e áreas *in situ* e invasoras. Os linfonodos regionais foram avaliados para a identificação da presença ou ausência de metástases. A identificação do subtipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e a padronização conforme o Consenso para o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores Mamários Caninos e Felinos-2019⁵⁻¹¹.

4.3 Histomorfometria das áreas de invasão

Os critérios considerados pelos três patologistas (GCD, EV, FM) para as áreas (focos) de invasão dentro do CMT e CMTM, foram a presença de grupos de células epiteliais atípicas com crescimento infiltrativo dentro do estroma, nessas áreas havia ausência de células mioepiteliais e não possuíam membrana basal. As áreas de microinvasão foram identificadas pela presença de áreas carcinomatosas *in situ* com focos periféricos microscópicos de diâmetro menor ou igual a 1 mm de células neoplásicas localizadas além da membrana basal. Foi realizado captura das fotomicrografias de lâminas por microscópio Olympus

BX41 usando o *software Spot Insight Color Capture System Advanced* com diferentes objetivas de todas as áreas invasoras presentes nas secções histológicas coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina, e realizou-se um estudo histomorfométrico com a ferramenta *ImageJ* versão 2.3.0, no qual foi realizado a mensuração do tamanho da área de focos de invasão, perímetro, comprimento (maior diâmetro), e quantificação do número de focos de invasão por campo, microinvasão e células isoladas. Para as fotomicrografias serem usadas no programa *ImageJ* realizamos a calibração conforme as objetivas do microscópio do LPC/UFMG, no programa as imagens são informadas em pixels e calibramos para micrômetro (μm). Na interface gráfica do software foram utilizadas ferramentas para mensurar o tamanho, perímetro e comprimento dos focos de invasão no estroma do tumor primário (*Polygon selections e Straight*), posteriormente os valores foram transformados em milímetros (mm). A quantificação das regiões de microinvasão foi realizada manualmente.

4.4 Imuno-histoquímica

Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica das amostras selecionadas com secções de 4 μm de espessura dos tumores primários, sendo preparadas e montadas em lâminas gelatinizadas. As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas com o anticorpo primário apropriado por 16 horas em câmara úmida a 4°C, receptor de estrógeno (ER; clone 1D5, Dako; 1:50), receptor de progesterona (PR; hPRa2; Neomarkers, Fremont, CA, EUA; diluição 1:50), receptor fator de crescimento epidérmico 2 (HER-2; 1:200, policlonal, Dako), cicloxigenase 2 (COX-2; 1:50, clone SP1, Invitrogen) e proliferação celular (Ki67; 1:50, clone MIB-1, Dako). Amostras de fragmentos de glândula mamária de cadelas positivas para ER, PR, COX-2, HER-2 e Ki67 foram utilizadas como controles de reação positiva. Os reagentes foram aplicados manualmente e a imunorreatividade foi visualizada incubando as lâminas com o diluente cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetracloreto (DAB) (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle, Reino Unido). As amostras foram lavadas com água destilada por 5 minutos e, em seguida, contra coradas com hematoxilina. Para controles negativos, o anticorpo primário foi omitido das amostras. Cromógeno foi adicionado a ambos.

A análise das lâminas, quantificação das imunorreações e classificação dos imunofenótipos Luminal A, Luminal B HER-2(+), Luminal B HER-2 (-), HER-2 superexpresso, foram realizadas conforme critérios estabelecidos por Nunes et al¹⁵. A análise semiquantitativa final de COX-2 foi realizada e estimada multiplicando-se uma distribuição de valor da marcação por um valor de intensidade de coloração, que varia de 0 a 12. Escores de 0 a 5 foram considerados baixos e escores de 6 a 12 considerados altos, sendo positivo escore maior que 6⁹. Os anticorpos utilizados foram padronizados em nossa rotina laboratorial e a especificidade antigênica foi testada de acordo com trabalhos publicados pelo nosso grupo¹⁻¹¹.

Os carcinomas em tumores mistos foram classificados conforme os imunofenótipos em Luminal A: ER e/ou RP- positivo, HER-2- negativo, Ki67 baixo (< 20%), Luminal B HER-2 positivo: ER e/ou RP +, HER-2 positivo, e qualquer Ki67 e Luminal B HER-2 negativo: ER e/ou RP +, HER-2 negativo, (Ki67 \geq 20%), HER-2 superexpresso: ER e/ou RP -, HER-2 positivo⁶⁻¹⁵.

4.6 Análise Estatística

Para testar a normalidade foi realizado o teste Shapiro-Wilk. Foi realizado o Teste T não pareado para as comparações entre os grupos com amostras que seguem a distribuição normal e o Teste Kolmogorov-Smirnov para a comparação entre os grupos de amostras que não seguem a distribuição normal. Foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Spearman e testes estatísticos de regressão linear para estabelecer correlações entre os dados clinicopatológicos das pacientes e os parâmetros das áreas de invasão. Para a correlação entre os dados clinicopatológicos e os parâmetros das áreas de invasão agrupadas, foi realizado o teste qui-quadrado e os dados foram representados no gráfico de contingência. A taxa de sobrevivência específica foi estimada usando a curva de Kaplan-Meier e as comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste log rank de Mantel-Cox. Essas análises foram realizadas utilizando o software Microsoft Windows, Prism (versão 7.0, GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). Para todas as análises, um valor de $p < 0,05$ foi considerado

estatisticamente significativo.

4.5 Sobrevida Específica

O acompanhamento da sobrevida das pacientes foi obtido entrando em contato por telefone com os médicos veterinários e tutores dos animais. A sobrevida específica foi calculada a partir da data do diagnóstico da doença até a data da morte/ eutanásia do animal pela doença neoplásica. Os animais que morreram ou que foram eutanasiados por outras doenças foram censurados.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

Dos 45 casos de cadelas diagnosticadas com carcinoma em tumor misto, a idade variou de 7 a 16 anos, com uma média de 11,5 anos. As raças mais comuns no estudo incluíram cães sem raça definida representando 18,42% (7/38) dos casos, Poodles 10,53% (4/38) e Beagles 7,89% (3/38), enquanto em 26,32% (10/38) dos casos as raças não foram informadas. As glândulas mamárias mais afetadas foram mama abdominal caudal 36,17% e as inguinais, com 23,40%. Os casos sem ulceração foram de 71,05% (27/38) dos casos e 10,53% (4/38) apresentaram ulceração, e em 18,42% (7/38) dos casos estes dados não foram informados. No que diz respeito ao tamanho das massas primárias avaliadas macroscopicamente, constatou-se que 42,11% (16/38) foram classificadas como T1 (< 3 cm), 26,32% (10/38) com T2 (3 a 5cm) e 31,58% (12 /38) como T3 (> 5 cm). Ao avaliar as metástases nos linfonodos regionais, observou-se que 13,16% (5/38) apresentaram macrometástases e os casos com micrometástases foram 36,84% (14/38). Em relação à caracterização dos subtipos moleculares, no CMTM, a frequência do Luminal A foi de 9 casos (47,4%), do Luminal B HER-2 positivo foi de 8 casos (42,1%), do Luminal B HER-2 negativo foi de 1 caso (5,3%), e HER-2 superexpresso foi de 1 caso (5,3%). Nos CMT, o Luminal A representou 9 casos (47,4%), o Luminal B HER-2 positivo foi observado em 6 casos (31,6%), o Luminal B HER-2 negativo em 2 casos (10,5%), e não houve casos de HER-2 superexpresso (0%).

5.2 Avaliação do tamanho, perímetro e número dos focos de invasão

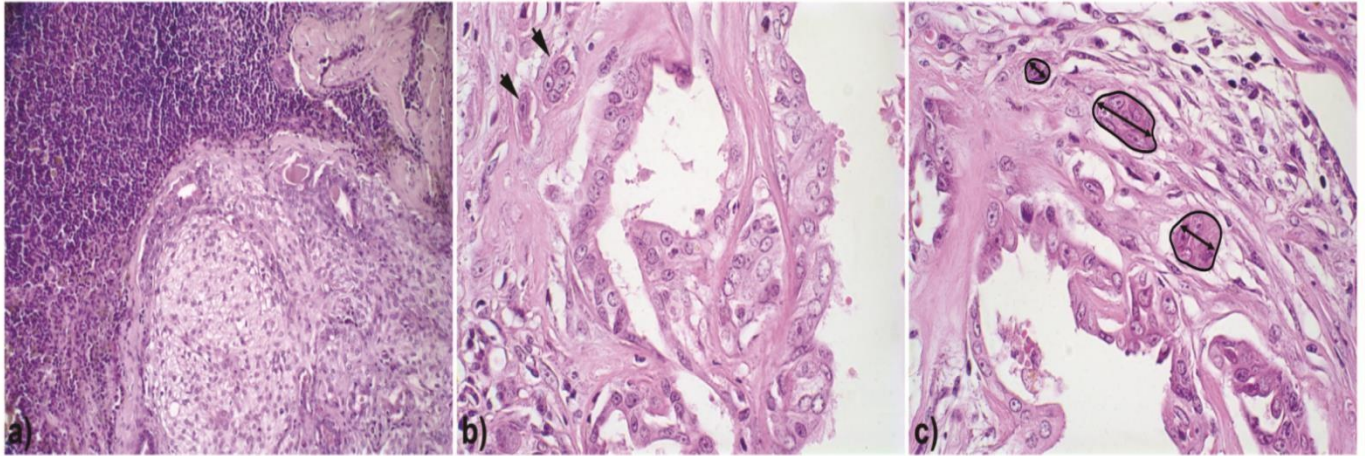


Figura 1. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto com metástase. **a.** Linfonodo com proliferação de células epiteliais atípicas com presença de matriz mixoide substituindo parte do parênquima linfóide (H&E) 20x. **b.** Área de invasão (seta) com a presença de células epiteliais atípicas infiltrando o estroma do CMT. Coloração por hematoxilina e eosina (H&E), 60x. **c.** Mensuração do tamanho da área invasão, perímetro e contagem dos focos de invasão e medida do comprimento (maior diâmetro) de no estroma do CMT (marcação em preto) (H&E) 60x.

A comparação entre o número dos focos de invasão no CMT e no CMTM está demonstrada na Figura 2a. Foi observado que o número de focos de invasão no CMTM é maior em comparação ao número de focos de invasão no CMT. A figura 2b mostra a comparação entre o tamanho dos focos de invasão no CMT e no CMTM. Entretanto, o tamanho dos focos de invasão é maior nos CMTM em comparação ao tamanho dos focos de invasão do CMT. Também foi demonstrado que o perímetro das áreas de invasão é maior no CMTM quando comparado com o perímetro do CMT (figura 2c). Além disso, foi observada uma correlação direta moderada entre o tamanho das áreas de invasão e a presença de metástase em linfonodo (figura 2d). Foi possível verificar que CMTM (em que foi atribuído o número 1) apresentaram maior tamanho das áreas de invasão, quando comparado com aos CMT (em que foi atribuído o número 0).

A Figura 2e mostra uma associação entre o número de focos de invasão e a presença de metástase nos carcinomas. Os CMT apresentaram maior percentual de casos com menos de 3 focos de invasão em relação ao percentual de casos com mais de 3 focos de invasão. Em contrapartida, os CMTM apresentaram maior

percentual de casos com mais de 3 focos de invasão em relação ao percentual de casos com menos de 3 focos de invasão. A Figura 2f apresenta a associação entre o tamanho dos focos de invasão e a presença de metástase nos carcinomas. Demonstrando que a maioria dos casos de CMT apresentam focos de invasão menor que 3mm^2 . Em contrapartida, a maioria dos casos de CMTM apresentaram focos de invasão maior que 3mm^2 .

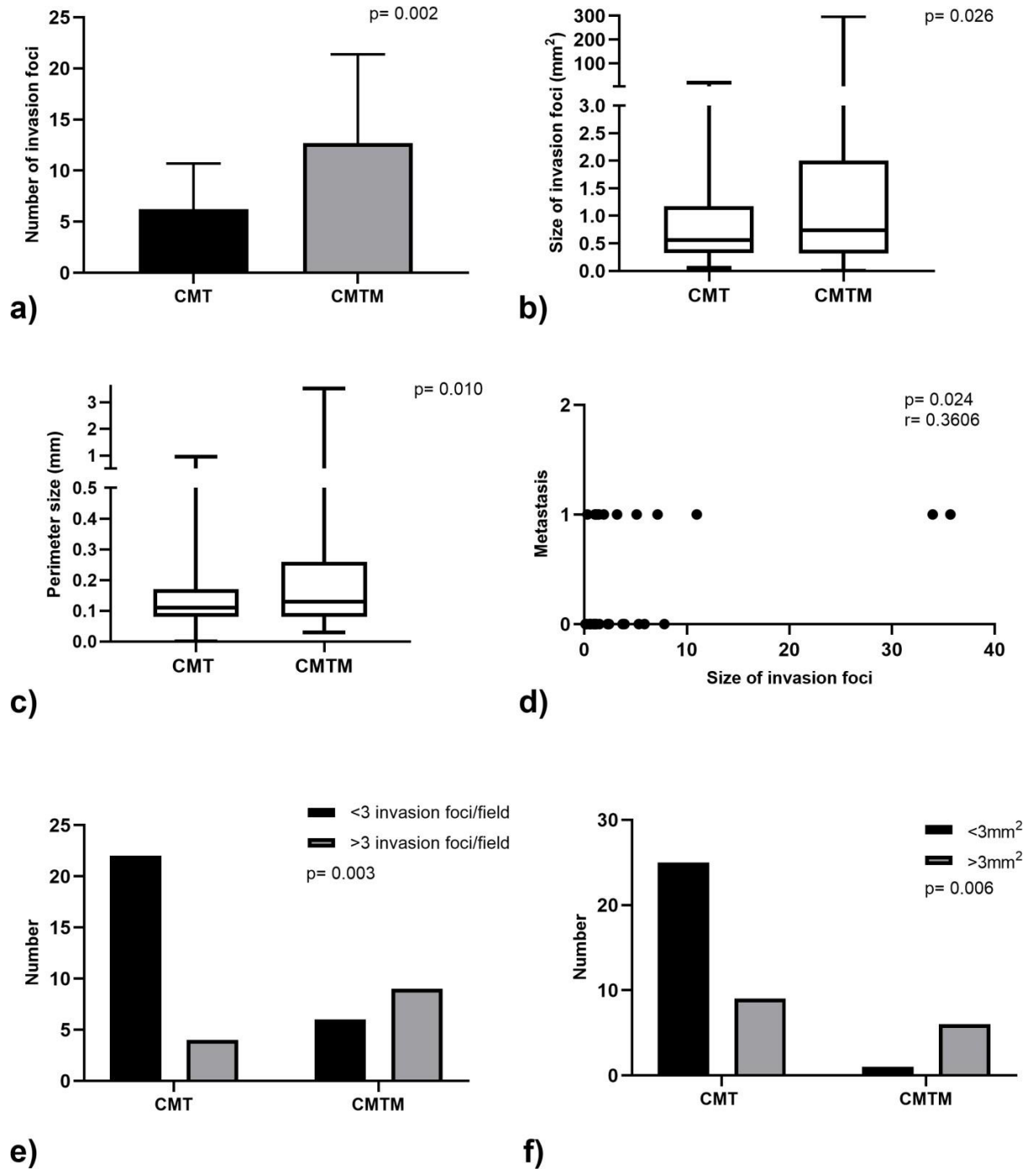


Figura 2. Avaliação do tamanho, perímetro e número dos focos de invasão no carcinoma em tumor misto sem metástase (CMT) e no carcinoma em tumor misto com metástase (CMTM). **a)** Comparação entre o número dos focos de invasão no CMT e no CMTM (Teste T não pareado). **b)** Comparação entre o tamanho dos focos de invasão no CMT e no CMTM (Kolmogorov-Smirnov). **c)** Comparação entre o perímetro dos focos de invasão no CMT e no carcinoma em tumor com metástase (Kolmogorov-Smirnov). **d)** Correlação entre a presença de metástase nos carcinomas (0 foi atribuído para o CMT e 1 para o CMTM). **e)** Associação entre o número de focos de invasão e a presença de metástase nos carcinomas. **f)** Associação entre o tamanho dos focos de invasão e a

presença de metástase nos carcinomas.

Foram realizadas comparações, correlações e associações entre áreas de microinvasão, comprimento das áreas invasoras, imunomarcadores e subtipo molecular e CMTM e CMT, porém não foram observadas diferenças estatísticas.

5.3 Avaliação da influência da presença de metástase regional, tamanho e número dos focos de invasão sobre a sobrevida específica

Para a avaliação da influência da presença de metástase regional sobre a sobrevida específica das pacientes, o tempo de sobrevida das cadelas diagnosticadas com CMT e daquelas diagnosticadas com CMTM foi comparado. As cadelas diagnosticadas com CMT apresentaram maior tempo de sobrevida específica (1015 dias) quando comparadas com cadelas diagnosticadas com CMTM (502 dias) (figura 3a).

Para a avaliação da influência do tamanho e do número dos focos de invasão sobre a sobrevida específica das cadelas as informações foram ordenadas em ordem crescente para definição dos pontos de corte para cada parâmetro avaliado. Para o tamanho da área de invasão o ponto de corte definido foi 2mm². As pacientes diagnosticadas com carcinomas com áreas de invasão menor que 2mm² alcançaram a mediana de sobrevida no 1052º dia. Em contrapartida, as pacientes diagnosticadas com carcinomas com áreas de invasão maiores que 2mm² alcançaram a mediana de sobrevida no 703º dia (figura 3b). Para a avaliação da quantidade de focos de invasão definimos o número 14 como ponto de corte. Pacientes diagnosticadas com carcinomas com menos de 14 focos de invasão alcançaram a mediana de sobrevida no 1015º dia. Em contrapartida, as pacientes diagnosticadas com carcinomas com mais de 14 focos de invasão alcançaram a mediana de sobrevida no 245º dia (fig 3c).

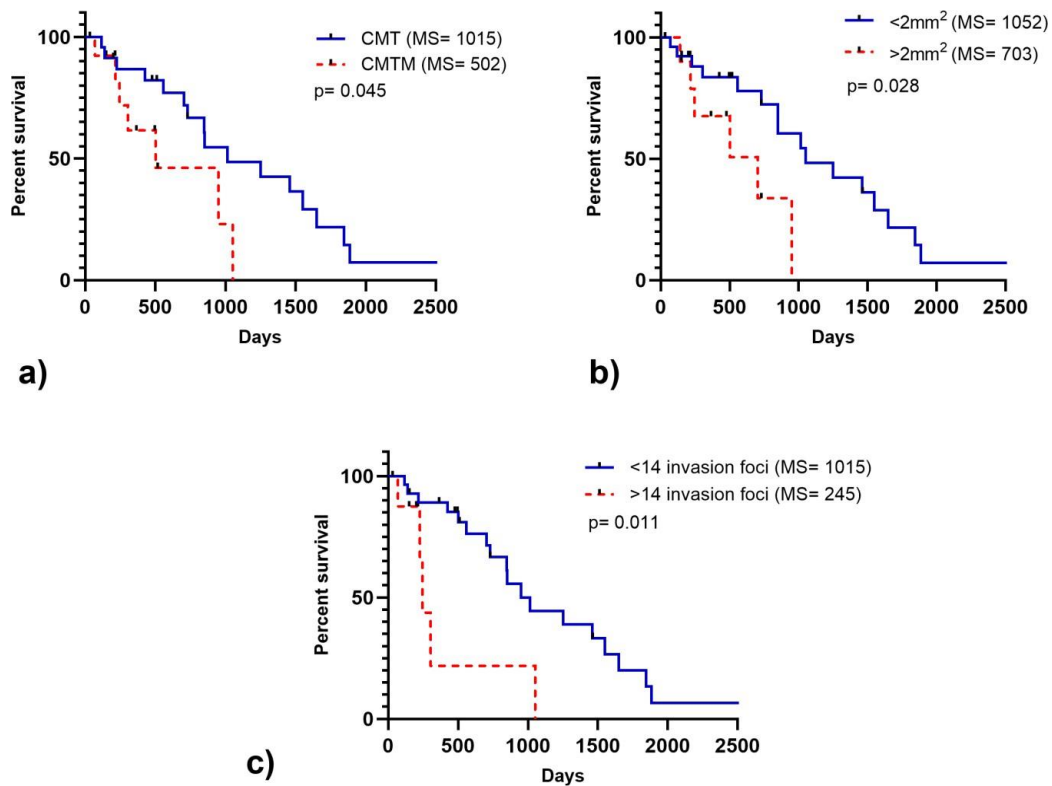


Figura 3. Curva de sobrevivência específica derivada da análise de Kaplan-Meier das pacientes diagnosticadas com carcinoma: (a) o grupo CMTM alcançou a mediana no 1015º dia e o grupo CMT foi no 502º dia. (b) Pacientes com tamanhos de áreas de invasão <math>< 2\text{mm}^2</math> alcançaram a mediana no 1052º dia e as que apresentaram tamanhos de áreas de invasão >math>> 2\text{mm}^2</math> a mediana no 703º dia. (c) Pacientes que o número de focos de invasão foi >math>> 14</math>, a mediana alcançada foi no 245º dia, e as que os números de focos de invasão foi <math>< 14</math> alcançou mediana no 1015º.

O tamanho do perímetro, comprimento dos focos de invasão, imunofenótipo e áreas de microinvasão dos casos não apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a sobrevida das pacientes.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma em tumor misto é o tipo histológico mais frequente de tumor de mama em cadelas que apresenta na maioria das vezes prognóstico favorável em relação a outros tipos histológicos².

8. Entretanto, este tipo histológico, eventualmente, pode progredir para metástase regional. Para avaliar o componente epitelial maligno invasor das neoplasias mamárias caninas, é recomendado usar o sistema de Nottingham, que é uma classificação histopatológica extremamente empregada em carcinomas mamários¹². Nesse sistema, o componente epitelial maligno é graduado com base em critérios que incluem a formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica. A contagem de mitoses é realizada em 10 campos de maior aumento de HPFs (High-power field). Entretanto, nos carcinomas em tumores mistos, nem sempre há áreas de invasão suficientes, portanto, nem sempre é possível avaliar 10 campos de maior aumento (HPF), como é recomendado pelo sistema de Nottingham e as áreas de microinvasão são desafiadoras devido ao seu tamanho limitado que impede a contagem mitótica⁸⁻¹⁵. Isso pode dificultar a graduação histológica dos carcinomas em tumores mistos, associado ao fato de tentar distinguir as áreas malignas invasoras associadas a áreas benignas e áreas carcinomatosas in situ. Essa heterogeneidade da proliferação epitelial pode representar um grande desafio na determinação precisa do grau histológico, por extensão, no estabelecimento do prognóstico e na tomada de decisões clínicas^{2,8}.

Dessa forma, este é o primeiro estudo que buscou avaliar cadelas com diagnóstico de carcinoma em tumor misto, com dois grupos distintos, um com a presença e outro com ausência de metástases nos linfonodos regionais e foi avaliada a contagem e mensuração das áreas carcinomatosas invasoras. A pesquisa investigou se o tamanho, perímetro, comprimento, número de focos das áreas de invasão no estroma dos carcinomas em tumores mistos estava relacionada ao prognóstico, especificamente se estava associado à presença de

metástases regionais e à sobrevida.

Os resultados principais do estudo indicaram que o número de focos e o tamanho da área de invasão no estroma do carcinoma em tumor misto está associado a uma maior probabilidade de desenvolver metástases regionais, resultando em uma menor sobrevida para as cadelas. Nos grupos de pacientes com carcinoma em tumor misto com metástase apresentou maior número de

focos e maior tamanho das áreas de invasão quando comparada ao grupo sem metástase (CMT). No entanto, estudos envolvendo carcinoma de mama microinvasivo, especialmente com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* com áreas de microinvasão, revelou que o número dos focos de microinvasão não parece influenciar o prognóstico e o significado clinicopatológico permanece incerto. São necessários mais estudos para esclarecer a importância dessas áreas no comportamento biológico do tumor ⁸⁻¹⁵.

Em relação ao perímetro da área de invasão, os carcinomas em tumores mistos com metástases possuem maior perímetro comparado com o grupo carcinoma em tumor misto sem metástase, entretanto não houve relação direta com a sobrevida. Esses resultados podem ser atribuídos às características dos tumores mistos e à sua progressão tumoral. Nas regiões invasivas, é observado um maior número de células que invadem o estroma, possivelmente devido ao menor comprimento das fibras colágenas, que podem estimular a invasão. Isso ocorre porque as fibras colágenas desempenham um papel crucial no direcionamento da invasão, associada ao remodelamento do microambiente tumoral²⁰.

Na análise de imunohistoquímica do nosso estudo foi observado entre os grupos, que o tipo Luminal A e Luminal B HER-2 positivo, foram os mais frequentes. Em um trabalho realizado com carcinoma mamários em cadelas, pacientes com metástases os tempos de sobrevida mais curtos foram associados ao imunofenótipo Luminal B HER- positivo¹⁶.

Adicionalmente, evidenciamos uma correlação direta moderada entre o tamanho da área de invasão e presença de metástase em linfonodo. O grupo CMTM, em comparação com o grupo CMT, apresentou maior tamanho de área de invasão. As associações entre o número de focos, tamanho da invasão e presença de

metástase dos carcinomas foram observadas. O Grupo CMT exibiu um percentual maior de casos com menos de 3 focos de invasão e áreas menores que 3 mm², enquanto os CMTM mostraram uma predominância de casos com mais de 3 focos de invasão e áreas maiores que 3 mm².

Esses resultados destacam a importância do *status* dos linfonodos no prognóstico das neoplasias mamárias em cadelas. A detecção de metástases nos linfonodos regionais é um fator crítico que pode influenciar significativamente o prognóstico e determinar a abordagem terapêutica para esses tumores. Na literatura, tanto em cadelas quanto em mulheres, está bem estabelecido que a presença de metástases nos linfonodos está associada a uma redução na sobrevida em comparação com pacientes que não apresentam metástases¹⁻²⁵.

Cavalcanti et al. (2006) observaram que em carcinoma em tumores mistos, o tamanho da área epitelial maligna invasora influenciou na sobrevida das cadelas. Aquelas que apresentaram maior tamanho da área carcinomatosa invasora tiveram um tempo de sobrevida menor. Em nosso estudo, encontramos resultados semelhantes ao observar a influência do número de focos e do tamanho da área de invasão na sobrevida; pacientes com mais focos de invasão e áreas de invasão maiores tiveram menor tempo de sobrevida. Além disso, cadelas diagnosticadas com CMT apresentaram maior tempo de sobrevida específica (mediana de 1015 dias) em comparação com aquelas diagnosticadas com CMTM (mediana de 502 dias). Segundo Nunes et al. (2019), que conduziram um estudo com tumores mistos, incluindo CMT junto com outros tipos histológicos, mostraram uma sobrevida maior, porém a mediana não foi atingida.

Estes resultados sugerem que o número de focos de invasão e o tamanho dessas áreas no estroma do carcinoma em tumor misto pode ser um fator importante na determinação do prognóstico das cadelas com tumores de mama, o que pode sugerir um pior prognóstico em termos de metástases e sobrevida. Os resultados apresentados são importantes e poderão ser utilizados para ajudar a orientar a abordagem clínica e o tratamento dos casos de CMT. Este achado confere aos CMT um potencial de malignidade, no qual o paciente pode evoluir a óbito devido a metástase.

7 CONCLUSÕES FINAIS

A partir da realização do estudo morfométrico das áreas de invasão dos carcinomas em tumores mistos em mamas de cadelas podemos concluir:

- O Grupo de carcinoma em tumor misto com metástase mostrou predominância de mais de 3 focos de invasão e áreas invasoras maiores que 3 mm².
- O tamanho dos focos de invasão é maior nos carcinomas em tumores mistos com metástases.
- Pacientes com carcinomas em tumores mistos com mais de 14 focos de invasão apresentaram menor tempo de sobrevida específica.
- Pacientes diagnosticadas com carcinomas em tumores mistos com áreas de invasão maiores que 2mm², tiveram menor tempo de sobrevida específica.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico de carcinoma em tumor misto é o mais frequente dentro da nossa rotina e são descritos como tumores de bom prognóstico. Entretanto, já é relatado que pacientes com este diagnóstico podem evoluir para metástases e a óbito.

O maior desafio para o patologista na rotina com os tumores mistos, é realizar a sua graduação, a heterogeneidade da proliferação epitelial pode representar um grande desafio na determinação precisa do grau histológico, e nem sempre é possível realizar em 10 campos maior aumento de HPFs (High-Power Field).

Na realização deste trabalho, assim como todo patologista iniciante, tivemos dificuldades na identificação das áreas *in situ* e de microinvasão. Mesmo as áreas invasoras, quando estão circundadas por proliferação mioepitelial suscitam dúvidas e muitas vezes o processamento e coloração do material de rotina comprometem a avaliação. O treinamento e avaliação e reavaliação das amostras permitiu uma maior segurança na identificação das lesões. Entretanto, sabemos que por maior que seja a experiência haverá sempre dúvidas.

No presente trabalho, conseguimos estabelecer critérios para definir as áreas de invasão, além de quantificar essas áreas nos carcinomas em tumores mistos. Também buscamos correlacionar o tamanho e o número das áreas de invasão com a sobrevida das pacientes.

9 REFERÊNCIAS

Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, et al. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 1360–1367.

Bertagnolli, A. C. et al. Canine mammary mixed tumors: Immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*. V. 89, N. 8, P. 312-317 (2011).

Carvalho MI, Pires I, Prada J, et al. Ki-67 and PCNA Expression in Canine Mammary Tumors and Adjacent Nonneoplastic Mammary Glands. *Vet Pathol* 2016; 53: 1138–1146.

Cassali G, Cavalheiro Bertagnolli A, et al. Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. *Vet Med Int* 2012; 2012:1–7.

Cassali G, Damasceno K, Bertagnolli A, et al. Consensus regarding the

diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Braz J Vet Pathol* 2017; 10: 87–99.

Cassali G, Jark P, Gamba C, Damasceno K et al. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. *Braz J Vet Pathol* 2020;13: 555– 74.

Cassali, G.D.; Nakagaki, Patologia mamária canina e felina do diagnóstico ao tratamento. 2. ed. São Paulo: Editora MedVet, 2023.

Cavalcanti MF, Cassali GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. *Revista Clínica Veterinária* 2006; 61: 56-63.

Cleary, M. P.; Grossman, M. E.; Ray, A. Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology*, p.1-12, 2010. doi:10.1177/0300985809357753

Damasceno, K. et al. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER- 3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. *Histol. Histopathol. Cell. Mol. Biol.* V. 31, P. 675–688 (2016).

Damasceno KA, Bertagnolli AC, Estrela-Lima A, Ribeiro LG, Rabelo BS, Campos CB, Barros AL, Cassali GD. Versican expression in canine carcinomas of benign mixed tumors: is there a relationship with clinical pathological factors, invasion and overall survival? *BMC Vet Res.* 2012;8:195-212

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* (1991) 19:403–10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.

Erdély, I. et al. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. *Histochemical and Cell Biology*, v. 124, n.2, p. 139-149, Aug. 2005.

Estrela-Lima, A.; Araújo, M. S. S.; Costa-Neto, J. M.; Teixeira- Carvalho, A.; Barrouin- Melo,

S. M.; Cardoso, S. V.; Martins-Filho, O. A.; Serakides, R.; Cassali, G. D.

Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates.

BioMed Central Cancer, v. 10, n 256, p. 1-14, 2010.

Feng C, Zheng Q, Yang Y. Breast Microinvasive Carcinoma With Different Morphologies: Analysis of Clinicopathologic Features of 121 Cases. *Breast Cancer (Auckl)*. 2020 Oct 5;14:1178223420948482. doi: 10.1177/1178223420948482.

Garcia, A. P. V. et al. Canine mammary cancer tumor behavior and patient survival time are associated with collagen fiber characteristics. *Scientific Reports*, V. 11, N. 1, P. 1–13 (2021).

Genelhu, M. C. L. S.; Cardoso, S. V.; Gobbi, H.; Cassali, G. D. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. *BioMed Central Cancer*,

v. 7, n. 218, p. 1–9, 2007. doi: 10.1186/1471-2407-7-218.

Hoda SA, Prasad ML, Moore A, et al. Microinvasive carcinoma of the breast: can it be diagnosed reliably and is it clinically significant? *Histopathology* 1999; 35: 468–470.

Karayannopoulou, M.; Kaldrymidou, E.; Constantinidis, T. C.; Dessiris, A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*, v. 133, p. 246–252, 2005. doi:10.1016/j.jcpa.2005.05.003.

Lana, S. E.; Rutteman, G. R.; Withrow, S. J. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636, 2007.

Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, et al. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas. *Vet Pathol* 2009; 46: 1275–1280.

Luna, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York, 1968.

Luini A, Aguilar M, Gatti G, Fasani R, Botteri E, Brito JA, Maisonneuve P, Vento AR, Viale G. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Mar;101(3):349-53. doi: 10.1007/s10549-006-9301-1.

Man S, LV Y, Ma R. Prognostic significance of metastatic lymph nodes ratio (MLNR) combined with protein-tyrosine phosphatase H1 (PTPH1) expression in operable breast invasive ductal carcinoma. *Cancer Manag Res* 2020; 12: 1895-1901

Misdorp W, Else RW, Hellmén E, et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. Vol VII. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1999, pp 1–59. Misdorp W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ (ed). *Tumors in domestic animals.* 4th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 2002, pp 575–606.

Misdorp W, Cotchin E, Hampe JF, Jabara AG, Von Sandersleben J. Canine malignant mammary tumors III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Vet Pathol.* 1973;10:241-56.

Nunes FC, Campos CB, Teixeira SV, et al. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2018; 70: 1714–1722.

Nunes FC, Damasceno KA, de Campos CB, et al. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Vet Anim Sci* 2019; 7: 100039.

Nunes FC, Bertagnolli AC, Lavallo GE, et al. The prognostic significance of immunophenotypes in canine malignant mammary tumors. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2022; 74: 299–309.

Auler PA, Bertagnolli AC, Ferreira E, et al. "Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization," *Veterinary Quarterly*, vol. 31, no. 4, pp. 173– 177, 2011.

Perez-Alenza MD, Pena L, Castillo N del, et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 2000; 41: 287–291.

Saad, E. S. A.; Lam, J. S. Y.; Al-khan, A. A.; Tayebi, M.; Day, M. J.;66 Richardson, S. J.; Danks, J. A. A Comparative Review of Mixed Mammary Tumors in Mammals. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 24, p. 125-137, 2018.

Saad, E. S.; Milley, K. M.; Al-khanL, A. A.; Nimmo, J. S.; Bacci, B.; Tayebi, M.; Day, M. J.; Richardson, S. J.; Danks, J. A. Canine Mixed Mammary Tumour as a Model for Human Breast Cancer with Osseous Metaplasia. *Journal of Comparative Pathology*, v. 156, n. 4, p. 352–365, 2017.

Shatat L, Gloyeske N, Madan R, O'Neil M, Tawfik O, Fan F. Microinvasive breast carcinoma carries an excellent prognosis regardless of the tumor characteristics. *Hum Pathol*. 2013 Dec;44(12):2684-9. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.010.

Santos KC, Requião LGT, Ribeiro LGR, et al. Tratamento com quimioterapia convencional e metronômica em estágio avançado de carcinoma em tumor misto - relato de caso. *Vet Bras Med Vet* 2016; 38: 131-138.

Sorenmo KU, Worley DR, Goldschmidt MH. Tumors of the Mammary Gland. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (eds). *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. 5th ed. Elsevier; 2013, pp.538-556.

10 ANEXO 1- APROVAÇÃO DO PROJETO NO CEUA-UFMG



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 333/2023
Título do projeto: Mensuração das áreas de invasão nos carcinomas em tumores mistos da glândula mamária canina e sua correlação com a sobrevida global
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Geovanni Dantas Cassali
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 11/12/2023. Validade: 11/12/2023 à 10/12/2028.

Belo Horizonte, 11/12/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

11 ANEXO 2- ARTIGO PUBLICADO



Article

The Number and Size of Invasion Areas in Mixed-Type Carcinoma in Female Dogs Are Associated with Regional Metastases

Fernanda Freitas Miranda ^{1,*}, Ana Paula Vargas Garcia ^{1,†}, Marina Possa dos Reys ¹, Erica Almeida Viscone ², Mayra Cunha Flecher ³, Michele Angela Rodrigues ¹ and Geovanni Dantas Cassali ^{1,*}

¹ Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; fernandafreitas@vetufmg.edu.br (F.F.M.); apvg@ufmg.br (A.P.V.G.); marinareys@ufmg.br (M.P.d.R.); michele.rodrigues@yale.edu (M.A.R.)

² Veterinary Diagnostic Center, Celulavet, Belo Horizonte 31365-000, MG, Brazil; ericaviscone@gmail.com

³ Department of Veterinary Medicine, University of Vila Velha, Vila Velha 45570-000, ES, Brazil; mayra.flecher@uvv.br

* Correspondence: cassalig@icb.ufmg.br or geovanni.cassali@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Mammary tumors in female dogs can be heterogeneous and difficult to classify. This study looked at specific features of cancer spread in these tumors to see if they could predict how aggressive the cancer would be. By measuring the size and number of cancer invasion areas, researchers found that tumors with more and larger invasion areas were more likely to spread to lymph nodes and were linked to shorter survival times in dogs. These findings suggest that measuring these features could help veterinarians better understand and predict the behavior of these heterogeneous mammary tumors.

Abstract: Mixed-type carcinoma (MTC) accounts for 44% of mammary neoplasms in bitches and poses challenges in histological grading due to the heterogeneity of invasive areas. The present study aimed to measure and characterize invasive areas in the stroma of MTC and investigate the association of those parameters with lymph node status and survival. Forty cases were analyzed and divided into two groups: with metastasis and without metastasis. The size, perimeter, length, and number of invasive carcinomatous areas were measured. Cases with metastasis showed a higher number of foci ($p = 0.003$) and larger invasive areas ($p = 0.006$) compared to cases without metastasis. Bitches with invasive areas larger than 2 mm² had shorter survival times. No association was found between the perimeter or length of invasive areas, the expression of Ki67, ER, PR, COX-2, HER-2, and the immunophenotype. Thus, the number and size of invasive areas are associated with regional lymph node status, suggesting histomorphometry may serve as a valuable tool for evaluating the biological behavior of mixed-type carcinoma.

Keywords: mammary gland; tumor invasion; lymph node; metastasis; tumoral stroma



Received: 17 February 2025

Revised: 25 March 2025

Accepted: 26 March 2025

Published: 31 March 2025

Citation: Miranda, F.F.; Garcia, A.P.V.; dos Reys, M.P.; Viscone, E.A.; Flecher, M.C.; Rodrigues, M.A.; Cassali, G.D. The Number and Size of Invasion Areas in Mixed-Type Carcinoma of Female Dogs Are Associated with Regional Metastases. *Vet. Sci.* **2025**, *12*, 318. <https://doi.org/10.3390/vetsci12040318>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mixed tumors are among the most frequently diagnosed neoplasms in the mammary gland of bitches, with a predominance of mixed-type carcinoma (MTC) [1], also referred to as carcinomas in mixed tumors [2]. A comprehensive epidemiological study involving 1539 cases of canine mammary tumors revealed that 85% of the lesions were