

ANA PAULA VARGAS GARCIA

**ESTUDO COMPARATIVO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS
COLÁGENAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR GERAÇÃO DE
SEGUNDO HARMÔNICO E MICROSCOPIA POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS**

**Belo Horizonte
2020**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS
COLÁGENAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR GERAÇÃO DE
SEGUNDO HARMÔNICO E MICROSCOPIA POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS**

Belo Horizonte
2020

ANA PAULA VARGAS GARCIA

**ESTUDO COMPARATIVO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS
COLÁGENAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR GERAÇÃO DE
SEGUNDO HARMÔNICO E MICROSCOPIA POR ABSORÇÃO DE DOIS FÓTONS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas/Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Patologia Investigativa
Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Paula

Belo Horizonte
2020

- 043 Garcia, Ana Paula Vargas.
Estudo comparativo da arquitetura e orientação das fibras colágenas em neoplasias mamárias caninas por geração de segundo harmônico e microscopia por absorção de dois fótons [manuscrito] / Ana Paula Vargas Garcia. – 2020.
72 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Paula.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Neoplasias da Mama. 2. Neoplasias Mamárias Animais. 3. Matriz Extracelular. 4. Colágeno. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Paula, Ana Maria de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 412 DE ANA PAULA VARGAS GARCIA


Realizou-se, no dia 17 de fevereiro de 2020, às 13 horas, Sala 241 – Bloco C – 3º andar/ICB – da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada *“Avaliação da Arquitetura e Orientação das Fibras Colágenas em Neoplasias Mamárias Caninas por Geração de Segundo Harmônico”*, apresentada por **Ana Paula Vargas Garcia**, número de registro 2018674468, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Geovanni Dantas Cassali – Orientador (UFMG), Profa. Ana Maria de Paula – Co-orientadora (ICEX/UFMG), Prof. Enio Ferreira (UFMG), Profa. Cristiana Buzelin Nunes (Faculdade de Medicina/UFMG).

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, 17 de fevereiro de 2020.



Ana Maria de Paula

Cristiana Buzelin Nunes

[Signature]

* 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.

FOLHA DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS
EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS POR GERAÇÃO DE SEGUNDO
HARMÔNICO”**

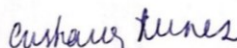
ANA PAULA VARGAS GARCIA

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

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:



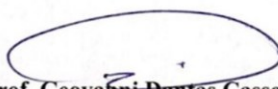
Prof. Enjo Ferreira
ICB/UFMG



Prof. Cristiana Buzelin Nunes
Faculdade de Medicina/UFMG



Prof. Ana Maria de Paula
ICB/UFMG - COORIENTADORA



Prof. Geovanni Dantas Cassali
ICB/UFMG - ORIENTADOR

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Viviane, ao meu pai, Cristian, ao meu irmão, Victor e àqueles que permitiram ser possível essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Viviane e Cristian, ao meu irmão, Victor, aos meus avós, Olinda e Tito e à minha grande amiga Kamilla, obrigada por serem o meu porto seguro e a minha sustentação durante esse período. Sem vocês eu não conseguiria... Essa conquista não é só minha, mas nossa!

Ao meu mentor e orientador, professor Geovanni, por me ensinar todos os dias que sempre precisamos estar dispostos a aprender coisas novas. Obrigada por todos os conselhos, oportunidades e aprendizados e por me tornar uma profissional cada vez mais qualificada. Obrigada por fazer eu me sentir parte integrante do Laboratório de Patologia Comparada.

Às meninas, Maíra e Thaíssa, que facilitam o meu dia-a-dia no laboratório, não só por me auxiliarem nos experimentos e na rotina do LPC, mas por todas as conversas que tornam aqueles dias difíceis mais leves.

À Karen, que me ensinou muito sobre histologia e histopatologia e que é um exemplo singular de que quando fazemos nosso trabalho com competência, dedicação e amor a única consequência é o sucesso. Obrigada por todas as oportunidades.

À Laíz, que foi uma das grandes responsáveis pelo meu crescimento dentro do laboratório e que me ensinou todos os passos da imuno-histoquímica, me permitindo aprender coisas que jamais imaginei. Obrigada por todo o aprendizado e por todas as risadas.

Ao pessoal do Laboratório *Celulavet* que, mesmo de longe, facilitam muito meu dia-a-dia no laboratório. Obrigada por fazerem tudo ficar mais leve.

À Alejandra e ao Diego, que me ensinaram muito sobre o “fazer científico”. Me corrigiram, elogiaram e, acima de tudo, me incentivaram a alçar cada vez voos mais altos. À Ana Emília, que com o seu jeito único, sempre me mostrou o quanto eu era capaz de alcançar tudo que sempre almejei. Vocês me impulsionaram e me motivaram a ir cada vez mais longe.

À professora Ana Maria, que acreditou em nosso trabalho e nos abriu portas para novas descobertas e novos conhecimentos. Obrigada por todo o apoio.

À Luana, que compartilhou comigo todas as inseguranças e incertezas que enfrentamos nesse difícil período político que estamos vivendo no país. Que me mostrou que a física não é um bicho de sete cabeças, mas apenas seis. Obrigada pela compreensão. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos estagiários de todos os cantos desse Brasil: Erick, Evelyn, Kamilla, Thaynan, Giu, Thamara e do mundo: Daiana... Obrigada pela amizade, pelo auxílio e por todos os aprendizados. Vou sempre levar vocês comigo. Vocês vão longe!

Ao pessoal do Laboratório do Comportamento Celular por sempre estarem disponíveis para me auxiliar e sanar várias dúvidas que surgiram ao longo desse período.

Aos demais colegas do laboratório que, mesmo sem muito tempo compartilhado, de alguma forma fizeram meu trabalho se desenvolver da melhor forma possível

Aos professores, técnicos e demais profissionais do departamento de Patologia do ICB/UFMG.

Ao departamento de Física do ICEX/UFMG.

Às agências de fomento, CNPq, FAPMIG e CAPES.

Aos professores, Dr.^a Cristiana Buzelin e Dr. Enio Ferreira e à Dr.^a Marina Rios, pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa da dissertação.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse excepcionalmente realizado...

Meu muito obrigada! Todos vocês fazem parte dessa história!

*E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos
demasiado certos de nossas certezas.*

Paulo Freire.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG e no Laboratório de Biofotônica do Departamento de Física - ICEx/UFMG com o apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Câncer de mama.....	20
2.2 Câncer de mama em medicina veterinária.....	21
2.2 Características histopatológicas das lesões mamárias.....	24
2.2.1 Tumores mistos.....	24
2.2.2 Carcinossarcoma.....	26
2.2.3 Carcinoma micropapilar.....	27
2.2.4 Carcinoma sólido.....	28
2.3 Neoplasias mamárias em cadelas como modelo experimental.....	29
2.5 Matriz extracelular durante a progressão tumoral.....	32
2.7 Microscopia por geração de segundo harmônico.....	35
2.8 Microscopia por absorção de dois fótons.....	38
3. HIPÓTESE.....	40
4. OBJETIVOS.....	41
4.1 Objetivo geral.....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41

5. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9. ANEXOS.....	66
10. APÊNDICES.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Desenho esquemático mostrando dois fótons com frequência ω gerando um fóton com o dobro da frequência.....	36
Figura 2.2 - Montagem experimental para obtenção das imagens de microscopia por SHG utilizando o microscópio confocal.....	36
Figura 2.3 - Estrutura da fibra colágena.....	37
Figura 2.4 - Fótons com mesma energia E_1 absorvidos pelo material quase simultaneamente e depois decaem emitindo a fluorescência.....	39
Figura 01 - Imagens representativas em corte transversal de cortes histológicos de mama corados com H&E, sinal de SHG, sinal de PL, angulação das fibras, rede de fibras e rede de células.....	46
Figura 02 - <i>Boxplots</i> apresentando os parâmetros de fibras colágenas e células em mama normal e em cortes histológicos de neoplasias mamárias.....	47
Figura 03 - <i>Boxplots</i> apresentando os parâmetros de fibras colágenas e células em tecidos mamários normais e regiões benignas (CTM áreas benignas), malignas <i>in situ</i> (CTM <i>in situ</i>) e malignas invasoras (CTM invasor) no CTM.....	48
Figura 04 - Gráficos das correlações de Spearman estabelecidas entre o comprimento médio das fibras colágenas e graduação histológica, proliferação celular e subtipo histológico.....	49
Figura 05 - Curvas de sobrevida para subtipo histológico e tamanho médio das fibras colágenas	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Caracterização das amostras de neoplasias mamárias caninas avaliadas.....	44
Tabela 02 - Significância estatística das comparações realizadas entre os tipos histológicos e mama normal	47
Tabela 03 - Significância estatística das comparações realizadas entre as áreas do carcinoma em tumor misto e mama normal	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA1 - breast cancer 1

BRCA2 - breast cancer 2

DM - dichroic mirror (espelho dicróico)

EAT - estroma associado ao tumor

HER-2 - receptor de crescimento epidérmico humano 2

H&E - hematoxilina e eosina

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICEx - Instituto de Ciências Exatas

INCA - Instituto Nacional do Câncer

M - presença de metástases à distância

N - envolvimento neoplásico de linfonodos regionais

MMP - metaloproteinase

OMS - Organização Mundial da Saúde

PL - photoluminescence (fotoluminescência)

PMT - photomultiplier (fotomultiplicadora)

RE - receptor de estrógeno

RP - receptor de progesterona

SHG - second harmonic generation (geração de segundo harmônico)

T - tamanho do tumor

TP53 - proteína 53

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

O câncer de mama apresenta grande importância para a saúde pública devido à alta morbimortalidade relacionada à doença. Neoplasias mamárias caninas apresentam grande similaridade epidemiológica, clínica, biológica e genética com o câncer de mama em mulheres e, por isso, têm sido consideradas adequados modelos de estudo desta neoplasia. Sabe-se que a matriz extracelular exerce um importante papel durante a progressão tumoral e, nesse processo, as fibras colágenas tornam-se mais organizadas e alinhadas. Acredita-se que esse evento esteja associado ao crescimento, invasão e migração tumorais, importantes processos no surgimento de metástases. Assim, o objetivo deste estudo foi correlacionar as alterações das fibras colágenas nos principais subtipos histológicos de carcinomas mamários caninos com o comportamento tumoral, sobrevida e características clinico-patológicas. Para isso foi realizado um estudo retrospectivo com 45 casos de neoplasias mamárias caninas em que foram selecionados 5 subtipos histológicos: tumor misto benigno, carcinoma em tumor misto, carcinosarcoma, carcinoma micropapilar e carcinoma sólido; e 12 amostras de mama normal. Foram realizadas análises de microscopia por geração de segundo harmônico e por absorção de dois fótons. Foram realizadas medidas em 950 diferentes regiões com a metodologia descrita. Foram selecionados 06 parâmetros: anisotropia, anisotropia local, número de fibras, tamanho médio das fibras, área de cobertura da fibra e área de cobertura de células, para as comparações entre os tipos histológicos e a mama normal. Foram utilizados os mesmos parâmetros para as comparações entre mama normal e regiões benignas, malignas *in situ* e malignas invasoras do carcinoma em tumor misto para avaliação das fibras colágenas durante a progressão tumoral. Posteriormente, foram realizadas correlações entre os parâmetros de colágeno analisados com graduação histológica, estadiamento clínico, proliferação celular, subtipo molecular e sobrevida. Os dados mostraram que em tecidos neoplásicos as fibras colágenas estão mais organizadas e alinhadas em relação aos tecidos normais. Foi possível observar uma maior organização do colágeno à medida que há progressão tumoral. No entanto, quando comparado o comprimento médio das fibras colágenas entre os diferentes tipos histológicos de carcinomas, observou-se que em tumores mais agressivos as fibras são menores em relação aos tumores menos agressivos, possivelmente devido à ruptura das fibras pelas células tumorais para infiltração do tecido circunjacente. O comprimento médio das fibras colágenas apresentou correlação com a sobrevida das cadelas e com subtipo histológico, graduação histológica e proliferação celular dos carcinomas mamários avaliados. Assim, a avaliação do colágeno pela técnica do segundo harmônico permitiu demonstrar diferenças no alinhamento das fibras de colágeno entre as neoplasias e a mama normal, durante as etapas da progressão tumoral. Também permitiu avaliar diferenças entre tumores mais agressivos e com prognóstico desfavorável e carcinomas menos agressivos. Além disso, foi possível estabelecer um ponto de corte para o comprimento médio da fibra quando correlacionado com a sobrevida das cadelas, sugerindo que a microscopia por geração de segundo harmônico poderia ser utilizada como um teste com valor prognóstico para o câncer de mama em cadelas.

Palavras-chave: carcinomas mamários, matriz extracelular, organização do colágeno, microambiente tumoral, progressão tumoral, cadelas.

ABSTRACT

Breast cancer has of great importance for public health due to the high morbidity and mortality related for disease. Canine mammary neoplasms have great epidemiological, clinical, biological and genetic similarities and, therefore, they have been considered good models for the study of breast cancer in women. It is known that the extracellular matrix plays an important role during tumor progress and, in the process, the collagen fibers become more organized and aligned. It is believed that this event is associated with invasions and the capture of tumors, which is important in the appearance of metastases. Thus, the aim of this study was to correlate the changes collagen fibers in the main subtypes of mammary carcinomas of dogs with the tumoral behavior and clinical-pathological characteristics. For this, a retrospective study was carried out with 45 cases of canine mammary neoplasm in which 05 histological subtypes were selected - benign mixed tumor, carcinoma in mixed tumor, carcinosarcoma, micropapillary carcinoma and solid carcinoma; and 12 samples normal mammary gland. Microscopy analyzes were performed through second harmonic generation and absorption of two photons. Measurements were taken in 950 different regions using the described methodology. Six parameters were selected - SHG anisotropy, local SHG anisotropy, no. fibres, mean fibre length, fibre coverage area and cell coverage area - for comparison between histological types and normal breast. The same parameters were used for comparisons between normal mammary regions and benign regions, malignant in situ and malignant invasive regions in the carcinoma in mixed tumor, for the evaluation of collagen fibers during tumor progression. Subsequently, correlations were carried out between the analysed parameters and the clinical-pathological data. The data showed that in neoplastic tissues the collagen fibers are more organized and aligned in relation to normal tissues. It was possible to observe a greater collagen organization as the tumor progression. However, when comparing the length of collagen fibers between the different histological types of carcinomas, was observed that in more aggressive tumors the fibres smaller in relation to less aggressive tumors, possibly due to the rupture of the fibres by the tumor cells for infiltration of the surrounding tissue. The mean fibre length showed a correlation with canine's survival and with histological subtype, histological grading and cell proliferation of the mammary carcinomas evaluated. Thus, the evaluation of collagen by the second harmonic generation technique allowed to demonstrate differences in the alignment of collagen fibers between neoplasms and the normal mammary gland, during tumor progression. It also made it possible to assess differences between more aggressive tumors with an unfavorable prognosis and less aggressive carcinomas. In addition, it was possible to establish a cutoff point for the mean fibre length when they are correlated with the survival of patients, suggesting that microscopy by second harmonic generation can be used as a test with prognostic value for canine mammary neoplasms.

Keywords: mammary carcinoma, extracellular matrix, collagen organization, tumor progression, tumor microenvironment, canines.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum que afeta mulheres em todo o mundo, motivando estudos sobre prevenção e diagnóstico precoce, na busca pela redução da morbimortalidade relacionadas a essa neoplasia (TORÍBIO *et al*, 2012). Possui interesse, também, em Medicina Veterinária principalmente pela elevada prevalência de tumores malignos em cadelas, em grande parte reflexo do diagnóstico tardio que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais (CAVALCANTI & CASSALI, 2006; ANDRADE *et al*, 2010; ESTRELA-LIMA, 2010). As neoplasias mamárias em cadelas e em mulheres apresentam similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas, o que possibilita a utilização da cadela como um modelo comparativo espontâneo (CASSALI, 2000; CASSALI, 2002; MISDORP, 2002; UVA *et al*, 2009; RIVERA & VON EULER, 2011; MARKKANEN, 2019).

Neoplasias mamárias estimulam alterações nos componentes da matriz extracelular. Tecidos neoplásicos são capazes de estimular alterações estruturais significativas nas fibras colágenas e, por isso, compreender a estrutura e as propriedades funcionais das fibras colágenas é de considerável interesse para compreensão do comportamento tumoral em diversos tipos de neoplasias mamárias (FALZON *et al*, 2008). O colágeno tem um papel significativo no surgimento de metástases, bem como na atividade de metaloproteinases (MMP) de matriz que resultou em um número considerável de estudos envolvendo prognóstico e terapêuticas do câncer de mama (HOMPLAND *et al*, 2008; BURKE *et al*, 2013; BURKE *et al*, 2013; BURKE *et al*, 2015; BARKUS *et al*, 2017; CASE *et al*, 2017; COKLIN *et al*, 2017). Estudos mostram que glândulas mamárias neoplásicas apresentam fibras colágenas mais organizadas e alinhadas em comparação com a mama normal e, por isso, a organização do colágeno apresenta correlação com prognósticos desfavoráveis (CASE *et al*, 2017; CONKLIN *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2019). Além disso, alterações na densidade do colágeno e na organização das fibras foram associadas ao grau do tumor e sobrevivência global em carcinomas mamários (CASE *et al*, 2017).

A maior organização do colágeno em neoplasias mamárias também está relacionada à migração e invasão das células tumorais por meio do mecanismo conhecido como durotaxia. Em geral, as propriedades mecânicas de um corpo são heterogêneas; por exemplo, a elasticidade macroscópica dos tecidos pode variar dependendo do tipo de tecido - nervoso, muscular ou ósseo. Mesmo em tecidos que compartilham os mesmos tipos celulares, a microscopia e a

distribuição espacial da elasticidade também é heterogênea (EBATA *et al*, 2019). Por isso, para que a migração celular ocorra espontaneamente em matrizes com diferentes gradientes de elasticidade é necessário que haja modificações no microambiente em que essas células estão inseridas. Quando matrizes macias e rígidas são unidas, as células aderentes exibem migração direcional da região mais macia para a região mais rígida, o que é denominado durotaxia. Embora muitos estudos tenham examinado a migração em um amplo gradiente de rigidez ou em um pico único de elasticidade, em geral as células são capazes de detectar um campo de elasticidade microscopicamente heterogêneo. (ZHANG *et al*, 2013; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019). Assim, acredita-se que as alterações ocorridas na matriz extracelular são essenciais no processo de rompimento da membrana basal pelas células tumorais, com consequente extravazamento e metastatização. Assim, a deposição de colágeno e a maior organização das fibras em tecidos neoplásicos pode estar associada essa característica de migração tumoral em carcinomas mamários (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama

Em 2018 cerca de 2,1 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama (HARBECK *et al.*, 2019). Esse dado corresponde a cerca de 25% dos casos novos a cada ano, sendo a neoplasia mais comum entre mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não melanoma. No Brasil este índice é de 29%. Em 2018 foram esperados cerca de 59.700 novos casos da doença no país. O número de mortes relacionadas à doença foi de 16.927 mulheres e 203 homens em 2017. A incidência anual de carcinomas mamários tem aumentado em cerca de 3,1% a cada ano, começando com 641 mil casos em 1980 aumentando para mais de 1,6 milhões em 2010. É possível que essa incidência continue aumentando (INCA, 2019).

O câncer de mama surge no ducto ou na unidade lobular (unidade funcional da mama). O mecanismo exato pelo qual o câncer de mama é iniciado ainda é desconhecido, porém, muitos estudos têm sido realizados para caracterizar molecularmente esse processo e delinear a formação e a progressão tumoral (HARBECK *et al.*, 2019). No nível da célula de origem, o modelo de evolução clonal (no qual mutações se acumulam devido a alterações epigenéticas nas células tumorais e as células “mais adaptadas” sobrevivem) e o modelo de células-tronco cancerígenas (em que apenas as células cancerígenas precursoras iniciam e sustentam a progressão) são amplamente estudadas. Dezenas de mutações genéticas foram identificadas em mulheres com câncer de mama, incluindo amplificações, mutações de perda de função, mutações de ganho de função e exclusões (RAZZAK, 2019).

A nível morfológico existe um contínuo processo de lesões e modificações genéticas nas glândulas mamárias levando ao desenvolvimento do câncer. A nível molecular, há evidências mostrando que o câncer de mama evoluiu ao longo de duas divergentes vias moleculares de progressão, principalmente relacionadas a expressão de receptores de estrógeno e a proliferação de tumores (HARBECK *et al.*, 2019). Além disso, a identificação de genes de susceptibilidade ao câncer de mama esclareceu alguns aspectos da patogênese da doença esporádica e herdada (RAZZAK, 2019). Clinicamente as características moleculares relevantes estão relacionadas ao receptor de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2), receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e mutações BRCA. Esses dados combinados com as características histológicas orientam o tratamento e são utilizados na pesquisa (RAZZAK, 2019).

Além dessas características, o clássico estadiamento TNM e a graduação histológica das neoplasias são indicadores prognósticos tradicionais e base do tratamento individualizado. A descoberta de vários subtipos clínico-patológicos de carcinoma de mama levou a uma melhor compreensão da biologia molecular e produziu um efeito na avaliação de risco de recorrência e clínica tratamento do câncer de mama (SAWAKI *et al*, 2018). O objetivo do sistema de estadiamento TNM é prever o prognóstico, em outras palavras, "risco de base" de câncer de mama no momento do diagnóstico e após a cirurgia. A principal utilidade do estadiamento é prever a recorrência subsequente em pacientes que não recebem terapia e para orientar se o paciente deve ou não receber quimioterapia adjuvante ou terapia endócrina ou terapia anti-HER2 (SAWAKI *et al*, 2018).

Devido à alta morbimortalidade associada ao câncer de mama, novas abordagens diagnósticas e terapêuticas têm sido demandadas. Assim, os tratamentos estão se tornando cada vez mais individualizados, com base nas características das células tumorais. Porém, o maior desafio atualmente é garantir que mulheres de todas as partes do mundo possam ter acesso ao diagnóstico de alto padrão de qualidade e tratamento (HARBECK *et al*, 2019).

2.2 Câncer de mama em medicina veterinária

Os carcinomas mamários são as neoplasias mais frequentes em medicina veterinária. As neoplasias da glândula mamária afetam, em sua maioria, cadelas idosas não castradas (DALECK *et al.*, 1998; DE NARDI *et al.*, 2002). A maioria das cadelas com lesões mamárias estão clinicamente saudáveis no momento do diagnóstico e as lesões podem ser identificadas pelo próprio proprietário ou por um profissional durante um exame físico de rotina (SORENMO, 2003). As neoplasias mamárias são comumente apresentadas como nódulos circunscritos com tamanho variável, consistência e mobilidade da pele e músculo. Podem estar associados à ulceração na pele e a reações inflamatórias. Frequentemente são observados múltiplos nódulos em uma única glândula mamária ou, ainda, mais de uma glândula afetada (tumores multicêntricos) que podem ser de diferentes tipos histológicos (KURZMAN *et al*, 1986; MISDORP, 1999).

A determinação do estadiamento clínico permite a definição da extensão da neoplasia, permitindo estabelecer um prognóstico e planejar o tratamento, dando indicações precisas ao anatomopatologista sobre o material submetido à análise (CASSALI *et al*, 2014). O estadiamento clínico é determinado de acordo com o Sistema TNM estabelecido pela

Organização Mundial de Saúde para tumores mamários caninos (anexo I). Com base nesse sistema são determinados o tamanho da lesão primária (T), a extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (OWEN, 1999).

Além disso, a classificação histopatológica do câncer de mama é importante para a avaliação da arquitetura da neoplasia, identificação das variações morfológicas do núcleo e determinação do grau histológico. Esses parâmetros apresentam significativa correlação com a agressividade tumoral. Atualmente, em medicina humana, o sistema de classificação mais utilizado é o Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998), substituindo avaliações subjetivas anteriores, quando o grau de diferenciação tumoral era estimado pela aparência geral do tumor. O grau histológico baseia-se na avaliação do índice de formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. O grau histológico é obtido por meio da soma das pontuações que resultam em um valor total que varia de 3 a 9 (anexo 2) (CASSALI *et al*, 2014). A classificação histopatológica pode variar consideravelmente, principalmente sobre os tipos histológicos mais comuns, como tumores mistos e carcinomas em tumores mistos (CASSALI *et al*, 2014). A classificação mais amplamente adotada é a de Misdorp *et al* (1999). O grau histológico é um fator prognóstico independente. Em um estudo epidemiológico realizado por Nunes e colaboradores (2018) verificou-se que a maioria dos carcinomas mamários caninos malignos estavam associados a um baixo grau histológico (I e II). Um maior tempo de sobrevida estava relacionado ao aumento na anaplasia, com apresentação de grau III e menor sobrevida global.

Além disso, ulceração, necrose e recorrência foram propostas como fatores prognósticos (CASSALI *et al*, 2014; NUNES *et al*, 2018). A ulceração pode ser causada pelo crescimento tumoral invasivo, isquemia ou infecção de pele, embora essas características não estejam necessariamente associadas a um comportamento biológico mais agressivo. A presença de metástases distantes é mais comumente encontrada nos pulmões, seguido pelo fígado, rins, baço, ossos, sistema nervoso central e pleura. Essas metástases distantes estão associadas a uma diminuição na sobrevida global do paciente (VON EULER, 2011; NUNES *et al*, 2018).

Um consenso para tumores mamários caninos foi proposto por Cassali e colaboradores (2014), contemplando uma classificação mais abrangente adotando novos subtipos não descritos por Misdorp *et al* (1999), a exemplo das lesões não neoplásicas e os carcinomas micropapilares (quadro 01).

Quadro 01: Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas.

Cassali *et al*, 2014 modificado de Misdorp *et al*, 1999.

Lesões epiteliais não-neoplásicas

Hiperplasias epiteliais

Hiperplasias ductais

Hiperplasias lobulares

Adenose

Lesões de células colunares

Alteração de células colunares

Hiperplasia de células colunares

Lesões de células colunares atípicas

Tumores benignos

Adenoma

Adenoma complexo ou adenomioepitelioma

Adenoma basalóide

Fibroadenoma

Tumor misto benigno

Papiloma ductal

Tumores Malignos

Carcinomas

Carcinomas *in situ*

Carcinoma ductal *in situ*

Carcinoma lobular *in situ*

Carcinoma em tumor misto

Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno

Carcinoma papilar

Carcinoma tubular

Carcinoma sólido

Carcinomas tipos especiais

Carcinoma micropapilar

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma lobular pleomórfico

Carcinoma secretor

Carcinoma mucinoso

Carcinoma rico em lípidos

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma anaplásico

Neoplasia mamária com diferenciação sebácea

Sarcomas

Fibrossarcoma

Osteossarcoma

Carcinossarcoma

Sarcoma em tumor misto

Outros sarcomas

Condrossarcoma puro

Lipossarcoma

Hemangiossarcoma

Fonte: CASSALI *et al*, 2014.

2.2 Características histopatológicas das lesões mamárias

Neste tópico serão abordadas as principais características das lesões mamárias estudadas neste trabalho.

2.2.1 Tumores mistos

Os tumores mistos benignos são caracterizados por proliferação benigna de células morfológicamente semelhantes aos componentes epiteliais (luminal ou células mioepiteliais) e mesenquimais que produzem cartilagem e/ou osso e/ou tecido adiposo, possivelmente em combinação com tecido fibroso (MISDORP *et al.*, 1999). As células mioepiteliais podem ser fusiformes ou estreladas e, geralmente, estão incorporadas a uma matriz extracelular abundante (matriz mixóide). A proliferação de células mioepiteliais em associação com a matriz mixóide é a origem da cartilagem ectópica observada em tumores mistos, sugerindo ser um resultado da transição epitelial-mesenquimal (ERDELYI *et al.*, 1991). Algum grau de pleomorfismo e atipia é frequentemente observado neste tipo de neoplasia, dificultando, muitas vezes, seu diagnóstico diferencial com o carcinoma em tumor misto. A histogênese dessas lesões ainda é bastante discutida, porém assume-se que todos os seus elementos, incluindo os mesenquimais, são originários das células mioepiteliais ou das células de reserva ductais. O tumor misto benigno é o tumor benigno mais comum em cães (MISDORP *et al.*, 1999; CASSALI *et al.*, 2014).

Os tumores mistos benignos da glândula mamária são pouco frequentes em humanos, porém são rotineiramente diagnosticados em glândulas salivares, sendo denominados tumores mistos ou adenomas pleomórficos (VOZ *et al.*, 2000). Estas neoplasias também podem sofrer a transformação maligna e originar carcinomas ex-adenomas pleomórficos (LEWIS *et al.*, 2011). Tanto em humanos como em cadelas fatores como o tempo de crescimento e a recorrência têm correlação com a malignidade (MOULTON *et al.*, 1970; AUCLAIR; ELLIS, 1996; LEWIS *et al.*, 2001; FOWLER *et al.*, 2006). Além disso, similaridades na expressão de moléculas como citoqueratina, p63, vimentina, β -catenina e E-caderina e mesma faixa etária de acometimento das lesões benignas e malignas sugerem patogênese semelhante nestes tumores (GENELHU *et al.*, 2007).

O carcinoma em tumor misto surge da transformação maligna epitelial em tumores mistos benignos (MOULTON *et al.*, 1970; MISDORP *et al.*, 1999). São os tumores malignos mais frequentes na glândula mamária da cadela, representando cerca de 42% das neoplasias

malignas CASSALI *et al*, 2009), podendo chegar a 56,7% (TORÍBIO *et al*, 2012). Esses tumores exibem um complexo padrão histológico, pois possuem componentes de origem epitelial e mesenquimal. Alguns desses componentes podem se transformar em componentes malignos, levando ao desenvolvimento de carcinomas. Os carcinomas em tumores mistos são aqueles que contêm focos ou nódulos de células epiteliais com elevado pleomorfismo e mitoses atípicas. A proliferação de células carcinomatosas pode invadir ou substituir completamente a lesão benigna pré-existente. As células epiteliais malignas exibem crescimento infiltrativo, que pode ser identificado pela perda da continuidade da camada basal/mioepitelial associada a aglomerados de células tumorais que penetram o estroma. A ocorrência de proliferações não invasivas (*in situ*) também pode ser observada (MISDORP *et al*, 1999; CASSALI *et al*, 2014).

A diferenciação entre os componentes *in situ* e invasores nos carcinomas em tumores mistos é possível devido a presença de invasão e microinvasão estromal. As áreas de invasão são caracterizadas pela presença de aglomerados de células epiteliais tumorais infiltrativas nas regiões de estroma periductal próximos aos componentes do carcinoma. A microinvasão é identificada em áreas *in situ* que tenham pequenas regiões em que há projeção de células neoplásicas que rompem a membrana basal (MISDORP *et al*, 1999; CASSALI *et al*, 2014). Por isso, os carcinomas em tumores mistos são amplamente utilizados como modelo para o estudo da progressão tumoral, uma vez que no mesmo tipo histológico podem ser encontradas regiões benignas, malignas *in situ* e malignas invasoras. Além disso, a abundância na quantidade de matriz extracelular permite avaliar as alterações que ocorrem na matriz durante a progressão tumoral (MISDORP *et al*, 1999; CASSALI *et al*, 2014). Os tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos podem progredir com formação óssea associada à presença de medula óssea (HELLMÉN, 2005), caracterizando uma metaplasia mioelóide (GRANDI *et al*, 2010; AULER *et al*, 2011). Aproximadamente 4% dos tumores mistos apresentam esta característica (AULER *et al*, 2011).

Carcinomas em tumores mistos benignos eram designados tumores mistos malignos. Esta denominação também era aplicada aos carcinossarcomas e por isso eram considerados sinônimos (HAMPE; MISDORP, 1974). Este último tipo histológico apresenta malignidade nos componentes epitelial e mesenquimal, diferente do carcinoma em tumor misto benigno, em que somente células epiteliais são malignas (MISDORP *et al*, 1999). Devido à distinção histológica, Misdorp e colaboradores (1999) propôs que o termo tumor misto maligno fosse extinto e substituído por carcinoma em tumor misto benigno, atualmente o mais utilizado.

Genelhu e colaboradores (2007) observaram similaridades clínicas, histopatológicas e antigênicas (para citoqueratinas, vimentina, β catenina e E-caderina) entre tumores mistos de glândula salivar humana e de glândula mamária. Uma histogênese semelhante para estas neoplasias e propõe o uso dos tumores mamários caninos como modelo de estudo para tumores mistos de glândula salivar humana. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo de transformação maligna de ambos os tipos histológicos ainda são incertos (BERTAGNOLLI *et al*, 2011).

Além disso, o microambiente tumoral também pode estar ativamente envolvido na transição do adenoma pleomórfico para carcinoma ex-adenoma pleomórfico (ARAÚJO *et al*, 2009). Análises imuno-histoquímicas demonstraram que o contato entre células tumorais e colágeno fibrilar tipo I, particularmente nas áreas invasoras pode estar associado com redução de E-caderina e β -catenina e com caráter invasivo dos carcinomas ex-adenomas pleomórficos (ARAÚJO *et al*, 2009). Supõe-se ainda que proteínas da matriz extracelular, como laminina e colágeno IV, assim como deposição de tenascina estejam relacionadas à malignização (FÉLIX *et al*, 2004).

2.2.2 Carcinossarcomas

Os carcinossarcomas são neoplasias raras em mulheres e têm um prognóstico ruim em relação a outros tipos de carcinomas. Na cadela, aspectos clínicos e patológicos se assemelham àqueles descritos em humanos (TOKUDOME *et al*, 2005; MISDORP *et al*, 1973; CASSALI *et al*, 2014). As características histológicas dos carcinossarcomas são extremamente variáveis e foram previamente descritos como tumores mistos malignos da glândula mamária. Macroscopicamente apresentam-se bem delimitados com uma superfície de corte firme.

Atualmente, a denominação carcinossarcoma é utilizada para descrever tumores mistos com componentes epitelial e mesenquimal malignos (MISDORP *et al*, 1999). São compostos por células que se assemelham morfológicamente a células epiteliais (epitélio luminal e/ou mioepitelial), podendo revelar padrões de crescimento e diferenciação bastante variáveis incluindo sólida, escamosa, áreas mucinosas, anaplásicas, associadas a áreas sarcomatosas com diferenciação fibro, condro e/ou osteomatososa (MISDORP *et al*, 1973; CASSALI *et al*, 2014).

A presença de matriz mixóide pode ser um indicador de que estes tumores são derivados de carcinomas em tumores mistos (MISDORP *et al*, 1973). A taxa de metástase é relativamente alta em relação aos carcinomas em tumores mistos (CASSALI *et al*, 2014). Alguns autores

comparam carcinomas em tumores mistos e carcinosarcomas da cadela com carcinomas metaplásicos de mama da mulher, uma vez que estes tipos histológicos apresentam características morfológicas semelhantes (GENELHU *et al*, 2007; SASSI *et al*, 2008).

O carcinoma metaplásico da mama da mulher é um termo genérico dado a um grupo heterogêneo de tumores que apresentam componentes epiteliais entre componentes mesenquimais, ou carcinomas escamosos primitivos dos elementos ductais, ou ainda adenocarcinoma com metaplasia escamosa (TSE *et al*, 2006). Estas neoplasias representam entre 0,2-5% de todos os carcinomas invasivos da mama (SCHWARTZ *et al*, 2013; WEIGELT *et al*, 2014). Os carcinomas metaplásicos frequentemente apresentam um prognóstico desfavorável e metástases são frequentes, mesmo quando os linfonodos regionais não estão acometidos (LUINI *et al*, 2007). Diante das similaridades morfológicas apresentadas entre carcinomas em tumores mistos e carcinosarcomas na mama da mulher, os tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinosarcoma são considerados bons modelos para estudo comparativo sobre progressão tumoral (CASSALI *et al*, 2014).

2.2.3 Carcinoma micropapilar

O carcinoma micropapilar da glândula mamária é uma neoplasia rara primeiramente descrita por Siriaunkgul e Tavassoli (1993) e reconhecida pela OMS como subtipo histológico independente em 2003 (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003), bem descrita em humanos, que está correlacionada com linfotropismo e prognóstico desfavorável. Em humanos esta neoplasia é considerada um fenótipo linfotrópico e metastatizante do câncer de mama, pois geralmente está associada com metástase para linfonodos regionais, metástase à distância e invasão linfática (SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993; MIDDLETON *et al*, 1999; NASSAR *et al*, 2001; ZEKIOGLU *et al*, 2004).

Macroscopicamente os carcinomas micropapilares humanos revelam tamanhos variáveis com médias que oscilam entre 1,5-4,2cm (KURODA *et al*, 2004; PETTINATO *et al*, 2004; MARINHO *et al*, 2007) e mesmo quando menores que 1cm possuem caráter agressivo e metastatizante (WALSH; BLEIDWEISS, 2001). Microscopicamente caracterizam-se por pequenas estruturas papilares, com ausência de tecido fibrovascular central, presentes no interior de formações císticas que, apesar de semelhantes a canais vasculares, apresentam negatividade para marcadores de células endoteliais como o fator VIII e CD-31 (SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993; DE LA CRUZ *et al*, 2004; PETTINATO *et al*, 2004).

Essas formações ainda demonstram ausência de membrana basal confirmando seu caráter invasivo (SIRIAUNKGUL; TAVASSOLI, 1993). A maior parte dos carcinomas micropapilares humanos são de subtipo misto (associado com outros carcinomas) e frequentemente apresentam alto grau histológico e associação com carcinomas ductais *in situ* (MARINHO et al., 2007).

Além da abordagem histopatológica, a análise imuno-histoquímica tem contribuído no diagnóstico definitivo do carcinoma micropapilar humano. A imunomarcagem para o Antígeno de Membrana Epitelial (EMA) na superfície voltada para o estroma tumoral de grupamentos de células epiteliais é considerada uma característica chave na identificação da neoplasia. Acredita-se que este fenômeno aconteça por um processo de reversão de polaridade das células epiteliais que adquirem propriedades secretórias apicais que culminam com expressão aberrante de EMA (NASSAR *et al*, 2004a; NASSAR, 2004b).

Em cães, esse tipo de neoplasia exibe comportamento semelhante ao observado em humanos, porém ainda são pouco descritos na literatura. Microscopicamente exibe espaços císticos bem delimitados semelhantes aos vasos linfáticos difusamente distribuídos por toda a glândula mamária. Dentro desses espaços císticos existem aglomerados de células epiteliais com padrão micropapilar chamado “moruliforme”, com citoplasma eosinofílico abundante, evidente pleomorfismo nuclear e nucléolos proeminentes. O índice mitótico é variável e comumente são observadas metástases em linfonodos e a distância (CASSALI *et al*, 1999a; CASSALI *et al*, 2000). Achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos evidenciaram positividade para EMA e HER-2, além de índices de proliferação celular elevados (CASSALI *et al*, 2002a). Gama e colaboradores (2008) relataram nove casos de carcinomas em tumores mistos caninos observando sobrevida global curta, altas taxas de metástase para linfonodos regionais e de invasão linfática e alto grau histológico. Diante destes achados dois novos sistemas para a classificação de neoplasias mamárias caninas foram propostos e incluíram os carcinomas em tumores mistos como subtipo histológico independente (CASSALI *et al*, 2014).

2.2.4 Carcinoma sólido

O carcinoma sólido é um tipo histológico comum em cães. Acredita-se que é o tipo mais avançado dos tumores, uma vez que é frequentemente observado quando as neoplasias se desenvolvem por longos períodos de tempo sem intervenção cirúrgica (MISDORP *et al*, 1999; CASSALI *et al*, 2002a; CASSALI *et al*, 2014). Microscopicamente há proliferação de células

epiteliais organizadas em arranjo sólido, com a formação de cordões, lençol ou aglomerados. As células tumorais são indiferenciadas, exibem pequenos núcleos hipercromáticos e o índice mitótico é alto. Alguns carcinomas sólidos consistem em células com citoplasma vacuolado, possivelmente de origem mioepitelial. A quantidade de estroma pode variar de pequena a moderada e áreas de necrose são frequentemente observadas (MISDORP *et al*, 1999; CASSALI *et al*, 2002a; CASSALI *et al*, 2014).

Um trabalho epidemiológico realizado por Nunes e colaboradores (2018) mostrou que as neoplasias malignas mais frequentes nas cadelas são os carcinomas em tumores mistos seguido pelo carcinoma sólido e carcinoma papilar invasivo. Neste estudo o carcinoma em tumor misto, carcinoma papilar invasivo e carcinoma tubular apresentaram melhor prognóstico. Em contrapartida, carcinomas micropapilares, carcinomas sólidos e carcinossarcomas foram os subtipos histológico associados a um pior prognóstico e menor sobrevida global (NUNES *et al*, 2018). A complementação terapêutica com terapias adjuvantes, como quimioterapia com dose máxima tolerada, é sugerida e pode ser benéfica para aumentar a sobrevida global do paciente, interferindo na progressão da doença (NUNES *et al*, 2018).

2.3 Neoplasias mamárias em cadelas como modelo experimental

Devido à fisiopatologia intimamente relacionada, as neoplasias que se desenvolvem naturalmente em cães domésticos têm sido progressivamente utilizadas como uma valiosa fonte de informações para entender melhor a biologia do desenvolvimento do câncer de mama em mulheres e, possivelmente, encontrar novos diagnósticos e terapêuticas relacionados a essa neoplasia (SORENMO *et al*, 2009; QUEIROGA *et al*, 2011b; ABADIE *et al*, 2017; NGUYEN *et al*, 2017; MARKKANEN, 2019). Por isso, muitos estudos têm se concentrado em avaliar os aspectos moleculares das células tumorais em cães comparando-as com as células tumorais em humanos.

Entre vários outros tipos de neoplasias, a ocorrência natural das neoplasias mamárias em cães tem sido vista como excelente modelo de estudo para o câncer de mama em humanos. O campo da oncologia comparativa visa abordar algumas deficiências existentes nas pesquisas, ampliando seu foco desde modelos clássicos de roedores até tumores espontâneos que se desenvolvem em animais. Esta perspectiva adicional é percebida como uma chance de complementar e aprimorar a compreensão de doenças complexas, como o câncer, em relação, principalmente, ao desenvolvimento tumoral, fatores de risco e mecanismos de tumorigênese.

Devido a muitas semelhanças compartilhadas entre cães e humanos, o cão doméstico tem sido considerado um dos melhores modelos em oncologia comparada (SORENMO *et al*, 2009; QUEIROGA *et al*, 2011b; ABADIE *et al*, 2017; NGUYEN *et al*, 2017; MARKKANEN, 2019).

O número de genes em cães e humanos são comparáveis evolutivamente e, por isso, as alterações conservadas no genoma são compartilhadas entre essas espécies. O câncer de mama se desenvolve espontaneamente nessas duas espécies e possui fisiopatologia, manifestações clínicas e histologia semelhantes (QUEIROGA *et al*, 2011b, LIU *et al*, 2014; BUNDESAMT FOR STATISTIK, 2015; MARKKANEN, 2019). Assim, o desenvolvimento de neoplasias espontâneas em cães apresenta fortes paralelos com o desenvolvimento e a progressão do câncer em humanos, sendo considerado o modelo animal mais próximo do ser humano. A maior expectativa de vida em relação a modelos de roedores e os mesmos fatores ambientais aos quais cães e humanos estão expostos, combinados ao fato dos cães frequentemente receberem um alto nível de assistência médica, fortalecem ainda mais essa análise comparativa entre cães e humanos (SORENMO *et al*, 2009; QUEIROGA *et al*, 2011b; ABADIE *et al*, 2017; NGUYEN *et al*, 2017; MARKKANEN, 2019). Além disso, foi demonstrado que certas raças de cães possuem genes de predisposição para certos tipos de câncer, facilitando as comparações entre alelos de risco responsáveis pela doença em mulheres. Assim, essas ideias enfatizam o potencial de utilização do cão como modelo para o câncer humano e oferecem a possibilidade de melhorar a compreensão da biologia tumoral e descoberta de novos biomarcadores (QUEIROGA *et al*, 2011b; ROWELL *et al*, 2011; BUNDESAMT FOR STATISTIK, 2015; CARVALHO *et al*, 2016c; MARKKANEN, 2019).

Em termos relativos (ou seja, converter “anos do cão” em “anos humanos”) a idade para início da vida reprodutiva é comparável em cadelas e mulheres. A incidência de neoplasias mamárias começa a aumentar após os 6 anos (o que equivale a 40 anos nas mulheres) e os picos estão entre os 8 e 14 anos (entre 50 e 70 anos em mulheres). Além disso, o câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres e cães (QUEIROGA *et al*, 2011b; ROWELL *et al*, 2011; BUNDESAMT FOR STATISTIK, 2015; CARVALHO *et al*, 2016c; OMS, 2019; MARKKANEN, 2019). A nível global, os carcinomas mamários ocorrem em mais de 40% de cadelas e apresentam taxa de incidência anual que varia entre 192 a 205 casos a cada 100.000 cães, comparável aos dados humanos com taxas de incidência de 125 casos a cada 100.000 mulheres nos Estados Unidos e 144 casos a cada 100.000 mulheres na Suíça (QUEIROGA *et al*, 2011b, LIU *et al*, 2014; BUNDESAMT FOR STATISTIK, 2015; MARKKANEN, 2019).

A histologia da glândula mamária normal é semelhante em cães e mulheres. Os ácinos e ductos da glândula mamária consistem em células epiteliais luminais revestidas por células mioepiteliais e são separados do tecido conjuntivo circundante pela membrana basal (LIU *et al*, 2014; SANTOS & MATOS, 2015). Nas duas espécies a formação de tumores é vista como um processo dinâmico a partir de lesões hiperplásicas benignas que podem evoluir para um carcinoma *in situ* (MARKKANEN, 2019). Em uma etapa posterior, essas neoplasias podem se tornar invasivas, marcadas pela ruptura da membrana basal e potencial de metástase. A nível molecular, muitas das principais alterações provocadas pelo câncer de mama na mulher são fielmente reconhecidas em carcinomas mamários caninos, incluindo mutações da linhagem germinativa em BRCA1, BRCA2 e TP53 que estão associados a um risco aumentado de câncer de mama hereditário em humanos (KARLSSON & LINDBLAND, 2008; MARKKANEN, 2019).

Além dos fatores clínicos, tamanho tumoral, envolvimento linfonodal e estágio clínico, o valor prognóstico dos aspectos histopatológicos como tipo e grau histológicos e subtipos moleculares (luminal A, luminal B, HER-2 positivo e basal) está conservado em carcinomas mamários caninos e humanos. Assim, as semelhanças entre as neoplasias nas duas espécies sugerem homologias abrangentes na biologia tumoral. Estudos em cães oferecem a oportunidade de encontrar novos biomarcadores não apenas para uso veterinário, mas também para benefícios em pacientes humanos (GILBERTSON *et al*, 1983; BURSTEIN *et al*, 2004; SIMPSON *et al*, 2005; SONRENMO *et al*, 2009; MARKKANEN, 2019). A utilização de modelos comparativos podem auxiliar na diferenciação das vias moleculares da doença, pois os principais genes relacionados estão conservados nas duas espécies (LIU *et al*, 2014; SANTOS & MATOS, 2015). Além disso, ensaios clínicos em cães podem ser realizados em um período mais curto em relação a estudos em humanos, devido a uma vida útil reduzida e manifestações clínicas da doença apresentadas mais precocemente nas cadelas (GILBERTSON *et al*, 1983; BURSTEIN *et al*, 2004; SIMPSON *et al*, 2005; SONRENMO *et al*, 2009; MARKKANEN, 2019).

A sinergia entre médicos veterinários, médicos humanos e outros profissionais científicos da área da saúde e do meio ambiente promovem uma iniciativa conhecida como “One Health”, com o objetivo de melhorar a vida de todas as espécies através da integração da pesquisa médica e veterinária. Essa abordagem de uma “saúde única” pode ser mais eficiente e transformar o tratamento do câncer de mama em mulheres e em cães simultaneamente (CASE *et al*, 2017; MARKKANEN, 2019). Esta abordagem implica não apenas em novos diagnósticos

e terapêuticas para pacientes oncológicos veterinários a partir de estratégias médicas de ponta em câncer de mama humano, mas também informa a medicina humana por meio de vantagens únicas da utilização do modelo espontâneo de câncer de mama canino (BURSTEIN *et al*, 2004; MARKKANEN, 2019).

Aproximadamente metade de todas as neoplasias da glândula mamária canina são malignas e, dependendo do subtipo histológico, estadió e grau histológico podem estar associadas a um risco significativo de recorrência local e distante (metástase). Semelhante ao que ocorre em humanos, existem dois grandes obstáculos que limitam resultados bem sucedidos em cães com carcinomas mamários: identificação precisa de cães com alto risco de recorrência e terapias eficazes para esses indivíduos em risco. A falta de indicadores prognósticos precisos resulta no aumento da morbimortalidade devido ao excesso de tratamento de pacientes com neoplasias malignas com baixo potencial metastático e terapias inadequadas para aqueles que requerem intervenção precoce e agressiva (BURKE *et al*, 2015; BARCUS *et al*, 2017; COKLIN *et al*, 2018; MARKKANEN, 2019).

2.5 Matriz extracelular durante a progressão tumoral

A maioria das neoplasias deriva de células epiteliais corrompidas dando origem a células tumorais que desconsideram os limites do tecido que naturalmente habitam. No entanto, essas células epiteliais tumorais não passam a viver em um ambiente isolado e estão longe de serem autossuficientes, pois dependem fortemente do microambiente para sua sobrevivência e crescimento (HANAHAHAN E COUSSENS, 2012). Esse microambiente, também chamado de estroma associado ao tumor (EAT), consiste em uma mistura de diferentes células não tumorais (entre elas fibroblastos, células imunes, células vasculares, adipócitos, entre outras), bem como a matriz extracelular. O EAT demonstrou desempenhar um papel fundamental na iniciação e progressão de uma ampla variedade de neoplasias, possuindo múltiplos papéis na biologia tumoral (MARKKANEN, 2019).

Estudos mostram que durante o desenvolvimento do tumor existe o aumento na deposição de fibras colágenas, demonstrando que o colágeno parece desempenhar uma função essencial nesse processo (HANAHAHAN E COUSSENS, 2012; MARKKANEN, 2019). Essa deposição de colágeno, conhecida como desmoplasia, aumenta a rigidez da neoplasia e do tecido adjacente. Ambientes que apresentam maior rigidez da matriz extracelular estimulam a progressão do câncer (SOUZA *et al*, 2018). Além disso, os tumores podem remodelar

ativamente a matriz extracelular circundante. As fibras de colágeno do tipo 1 e tipo 3, quando alinhadas, aumentam a rigidez da matriz extracelular e isso prediz piores prognósticos, particularmente em cânceres receptores de estrógeno positivos (BARCUS *et al*, 2017; SOUZA *et al*, 2018). Estudos recentes têm descrito que essa rigidez da matriz extracelular é fundamental no processo de migração celular, invasão e metastatização do câncer (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019).

Numerosos estudos indicam que o colágeno desempenha um papel fundamental no microambiente tumoral, exercendo um papel crítico na regulação do crescimento neoplásico e disseminação de células tumorais, devido à sua capacidade de fornecer orientações físicas, bioquímicas e biomecânicas para as células tumorais e não tumorais (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019). De fato, o aumento da densidade mamária, que se correlaciona com a abundância do tecido fibroso rico em colágeno, é um dos fatores de risco mais conhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama. Dados mais recentes revelam que assinaturas específicas de colágeno associado ao tumor podem prever recorrência das neoplasias mamárias em mulheres e em modelos murinos (CASE *et al*, 2017; BARCUS *et al*, 2017; WANG *et al*, 2017; CONKLIN *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2019) e destacam a importância da organização do colágeno durante a progressão tumoral. Assim, o colágeno pode determinar um papel permissivo ou restritivo ao tumor e, por isso, estudos recentes sugerem que o colágeno pode ser utilizado como alvo terapêutico para controle do câncer (CASE *et al*, 2017; NATAL *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2019).

A migração de células através da matriz extracelular é um processo dinâmico complexo que envolve uma série de atividades celulares e extracelulares, incluindo o desenvolvimento de lamelipódios, formação de locais de adesão focal, locomoção por meio da contração da actina e fixação (MIERKE, 2019). A motilidade celular é importante para muitos processos fisiológicos, como cicatrização de lesões, reparação, resposta imune e desenvolvimento de órgãos e tecidos, bem como processos patológicos como a progressão tumoral. Em geral, uma neoplasia pode se transformar em uma doença sistêmica maligna quando as células cancerígenas conseguem migrar do sítio primário do tumor por meio do estroma tumoral circundante (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019). O movimento direcional das células é um fenômeno essencial nos organismos vivos. Em geral, os fatores que determinam essa migração

celular são gradientes de produtos químicos, rigidez, corrente elétrica, luz, gravidade e outros. Entre esses indutores da quimiotaxia celular existe um gradiente de rigidez na matriz extracelular que leva as células em direção à região mais rígida. Esse processo é conhecido como durotaxia. A durotaxia está envolvida em vários processos de desenvolvimento e progressão de doenças (ZHANG *et al*, 2013; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019).

A migração unidirecional de células refere-se à capacidade de uma célula se movimentar persistentemente em uma direção específica, geralmente em resposta a um sinal extracelular que inclina a direção do movimento. Sinais no espaço extracelular podem agir para atrair ou repelir a célula (DUCHEZ *et al*, 2019). A quimiotaxia, o mecanismo mais amplamente estudado e melhor caracterizado de migração direcionada, envolve uma resposta a produtos químicos difusíveis. As células podem responder a um estímulo químico e se polarizar temporariamente movendo-se direcionalmente em um ambiente que não possui condição de gradiente. No entanto, a ausência de um forte gradiente externo para “polarizar” a direção do movimento celular resulta em uma população de células que migram aleatoriamente. A durotaxia é um mecanismo de migração direcional em que uma célula responde a um gradiente de rigidez extracelular. Normalmente a migração durotática envolve o movimento celular em direção a regiões de crescente rigidez em substratos cada vez mais rígidos (ZHANG *et al*, 2013). Assim, fica destacada a importância do aumento da rigidez da matriz extracelular durante esse processo de migração celular.

Ao considerar o potencial biológico da durotaxia em células cancerígenas é importante notar que as células malignas frequentemente encontram um microambiente diverso que orienta quimicamente e mecanicamente a adesão celular. Para gradientes quimiotáticos nos quais altos níveis de substâncias quimioatraentes podem suprimir a quimiotaxia, estudos estabelecem que altos níveis de rigidez mecânica da matriz extracelular também podem suprimir a eficiência da durotaxia (ZHANG *et al*, 2013, DUCHEZ *et al*, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019). Por isso, considera-se que concentrações precisas de sinais químicos e físicos são necessários para que esse mecanismo ocorra em condições ideais. Além disso, estudos têm sugerido que a remodelação da matriz extracelular por fibroblastos também pode ser modulada pela rigidez local dos componentes dessa matriz (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019).

O estroma extracelular rígido que cerca as células neoplásicas pode oferecer uma rota de fuga durotática do potencial ambiente hipóxico e necrótico para as células tumorais.

Condições inóspitas podem desencadear uma sensibilidade mecânica inata a fim de direcionar as células cancerígenas para um ambiente em que as condições estejam mais favoráveis (DUCHEZ *et al*, 2019). Um fenômeno análogo pode ser a ativação da transição epitelial-mesenquimal em resposta a condições do microambiente tumoral que melhoram o extravasamento celular e a metástase (GAMBA *et al*, 2014; GAMBA *et al*, 2015). A rigidez elevada também pode promover a proliferação celular, favorecendo o crescimento tumoral. O limite entre a região de tumor e o estroma circunjacente pode ser responsável por ativar o gradiente de rigidez, em que as células encontram uma grande diferença na rigidez da matriz extracelular e se movimentam para outros locais (FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; MIERKE, 2019). Existem evidências de que o potencial de criação de gradientes locais é alcançado por meio do remodelamento da matriz extracelular, principalmente com a participação de células estromais tumorais. Fibroblastos, fibras colágenas e fibronectina transmitem tensão à matriz extracelular (DUCHEZ *et al*, 2019). À medida que essa tensão se dissipa cada vez mais longe da fonte contrátil um gradiente de rigidez pode ser gerado. Células cancerígenas podem escapar de um tumor primário ao longo desses caminhos de tensão criados na matriz extracelular. Acredita-se que exista uma combinação de múltiplos fatores ambientais que determinam a direção na qual uma célula se movimenta, assim como em qualquer outra forma de migração direcionada (ZHANG *et al*, 2013; FRIEDL & BROCKER, 2019; DUCHEZ *et al*, 2019; EBATA *et al*, 2019; MIERKE, 2019; MORIYAMA & KIDOAKI, 2019).

2.7 Microscopia por geração de segundo harmônico

A geração de segundo harmônico (SHG do inglês *second harmonic generation*) é um processo coerente no qual dois fótons de energia mais baixa são convertidos para exatamente o dobro da frequência incidente (metade do comprimento de onda) de um laser de excitação (figura 2.1). A imagem biológica obtida por SHG foi relatada pela primeira vez em 1986 quando Freund investigou a polaridade das fibras de colágeno no tendão da cauda de um rato com uma resolução de 50 micrômetros. Em 2011, Mohler e Campagnola relataram a implementação prática de imagens de tecidos em alta resolução e aquisição rápida de dados utilizando o escaneamento a laser e, desde então, a microscopia por SHG tem sido uma ferramenta cada vez mais utilizada. A maioria dos relatos recentes sobre imagens microscópicas por SHG concentra-se em visualização de fibras colágenas na matriz extracelular em uma variedade de tecidos conjuntivos e órgãos internos (CAMPAGNOLA & DONG, 2011). A figura 2.2 mostra a

montagem experimental para obtenção das imagens de microscopia por SHG utilizando o microscópio confocal.

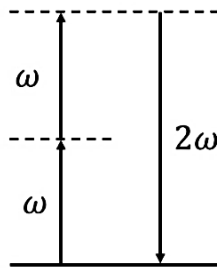


Figura 2.1: Desenho esquemático mostrando dois fótons com frequência ω gerando um fóton com o dobro da frequência. Fonte: GARCIA, 2018.

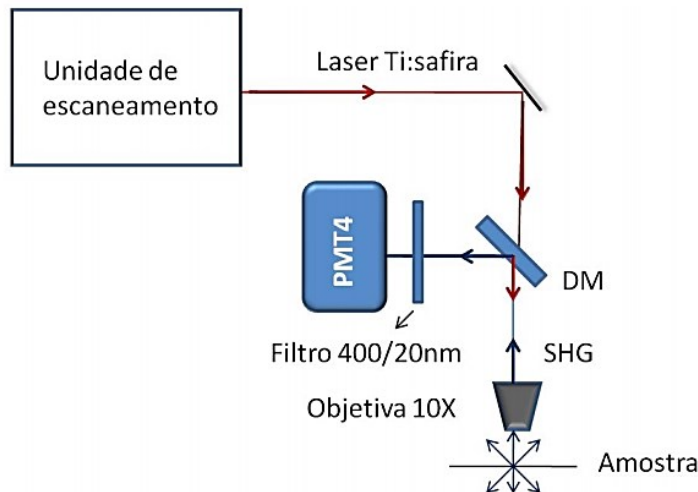


Figura 2.2: Montagem experimental para obtenção das imagens de microscopia por SHG utilizando o microscópio confocal. Fonte: GARCIA, 2018.

O colágeno tipo I é o componente predominante da matriz extracelular e do tecido conjuntivo. O colágeno é uma tripla hélice, com aproximadamente 300 kilodaltons. As moléculas individuais, chamadas de tropocolágeno, se associam covalentemente em fibrilas de aproximadamente 20-250 nanômetros de diâmetro para posteriormente formar fibras de aproximadamente 500 nanômetros a vários microns de diâmetro (figura 2.3) (FALZON *et al*, 2008; CAMPAGNOLA & DONG, 2011; CASE *et al*, 2017; BARCUS *et al*, 2017; WANG *et al*, 2017; CONKLIN *et al*, 2018). A microscopia por SHG tem várias vantagens que a tornam ideal para a obtenção de imagens de tecidos *in vivo*. Um atributo particularmente forte é que a microscopia por SHG visualiza a estrutura do tecido porque o contraste é produzido puramente a partir de espécies endógenas (CAMPAGNOLA & DONG, 2011). Por outro lado, imagens com corantes exógenos e proteínas coloridas só podem inferir aspectos estruturais. Os sinais de

SHG surgem de uma polarização induzida ao invés de uma absorção, o que leva a uma fotodegradação e fototoxicidade substancialmente reduzidas em relação aos métodos de fluorescência. Além disso, como os comprimentos de onda fundamentais do laser estão no infravermelho (entre 700-1000 nanômetros) a microscopia por SHG pode obter imagens com melhor resolução para profundidades de várias centenas de microns (CAMPAGNOLA & DONG, 2011; CASE *et al*, 2017; BARCUS *et al*, 2017; WANG *et al*, 2017).

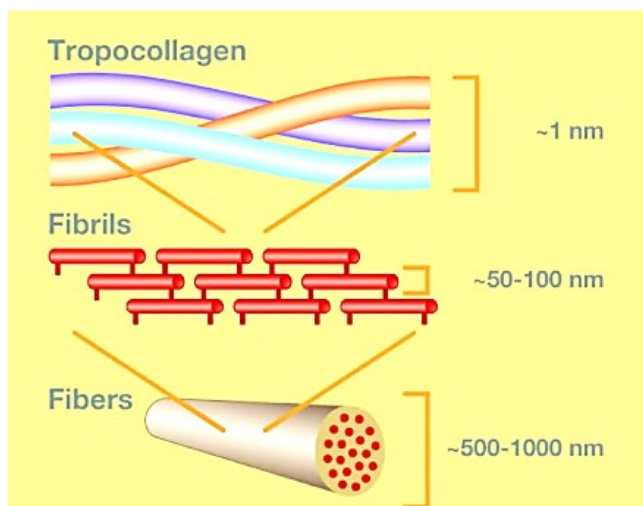


Figura 2.3: Estrutura da fibra colágena. Fonte: CAMPAGNOLA, 2011.

Diversos estudos na área humana identificaram, por meio da microscopia por SHG, que durante a progressão tumoral do câncer de mama as fibras colágenas se tornam mais alinhadas em comparação com a mama normal, predizendo prognósticos desfavoráveis (FALZON *et al*, 2008; CAMPAGNOLA & DUNG, 2011; BARCUS *et al*, 2017; WANG *et al*, 2017; CONKLIN *et al*, 2018; GARCIA *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2019). Um estudo realizado por Case *et al*, em 2017, examinou o papel potencial do colágeno na modulação do metabolismo biológico e no comportamento das neoplasias mamárias em cães. Neste estudo ficou confirmado que a organização e o alinhamento das fibras colágenas, reveladas por imagens de SHG em carcinomas mamários caninos são preditivos de resultados clínicos agressivos. Os pesquisadores identificaram que a falta de um limite definido entre estroma e tumor e um aumento na largura das fibras colágenas estão associados a prognósticos desfavoráveis. Essas descobertas direcionam para a hipótese de que o colágeno pode ser utilizado como um biomarcador prognóstico de neoplasias mamárias caninas, melhorando o sucesso terapêutico em cães (CASE *et al*, 2017). Semelhante ao câncer de mama humano, a densidade mamográfica em biópsias de carcinomas está inversamente relacionada à sobrevida

de pacientes caninos. Apesar da densidade não ser um dado útil para melhorar o prognóstico da doença, os dados do estudo sugerem que estratégias terapêuticas que suprimem respostas desmoplásicas, particularmente aquelas que estimulam a deposição de colágeno, podem melhorar a sobrevivência dos cães (CASE *et al*, 2017). Estudos recentes revelaram que a organização do colágeno e a rigidez da matriz extracelular são tão importantes quanto a densidade na mediação do crescimento e invasão tumorais (CONKLIN *et al*, 2018; GARCIA *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2018; NATAL *et al*, 2019). Porém, os trabalhos supracitados não foram capazes de relacionar a organização do colágeno com a sobrevivência das pacientes, tanto em mulheres como cadelas. Neste trabalho foi possível estabelecer uma correlação entre a organização do colágeno e a sobrevivência das cadelas diagnosticadas com carcinomas mamários, além de ter sido possível estabelecer um ponto de corte para o comprimento médio das fibras colágenas, sugerindo que a microscopia por geração de segundo harmônico pode ser utilizada como um teste com valor prognóstico para o câncer de mama em cadelas.

2.8 Microscopia por absorção de dois fótons

A absorção de dois fótons é o processo pelo qual uma molécula ou material absorve um par de fótons, cuja soma de energia é igual à energia de transição. A probabilidade de uma molécula sofrer a absorção de dois fótons quando exposta à luz de uma determinada energia de fótons (ou combinação de energia de fótons) depende de certas características do material e do ambiente em que a molécula está imersa. Assim, a microscopia por absorção de dois fótons pode ser utilizada como uma ferramenta para sondar as propriedades das moléculas, por exemplo para descobrir a energia dos estados ativos de dois fótons por meio da força das transições na absorção por dois fótons e as diferenças de estrutura eletrônica entre o estado fundamental e os estados excitados do sistema. Desde a primeira demonstração experimental da absorção por dois fótons, houve um interesse nesse tipo de espectroscopia para o estudo de propriedades básicas de materiais e de interações matéria-luz (RUMI & PERRI, 2010).

O processo de excitação de um material por dois fótons consiste em um processo óptico não linear que envolve a absorção quase simultânea de dois fótons por um dado material quando a energia desses fótons é combinada (os fótons podem ter energias iguais E_1+E_1 ou diferentes E_1+E_2 , podendo ser obtida com lasers diferentes) de forma suficiente para induzir uma transição do estado fundamental para um estado excitado) (IMIOLEK, 2014). A figura 2.4

mostra o tipo mais simples de excitação por absorção de dois fótons, onde dois fótons com a mesma energia são combinados.

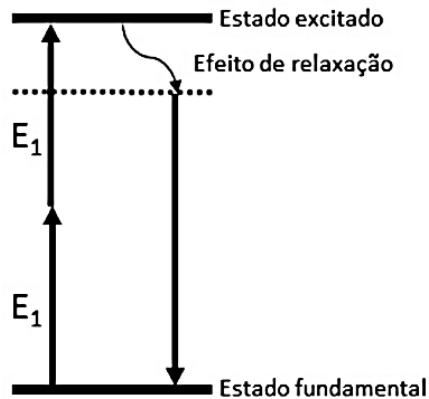


Figura 2.4: Fótons com mesma energia E_1 absorvidos pelo material quase simultaneamente e depois decai emitindo a fluorescência. Fonte: Rumi & Perri, 2010.

A microscopia por absorção de dois fótons é uma das invenções recentes mais importantes da instrumentação de microscopia óptica, pois permitiu imagens tridimensionais não invasivas de amostras biológicas com excelente resolução. As principais vantagens deste tipo de microscopia incluem danos fototóxicos reduzidos, possibilitando a criação de imagens de materiais vivos e detecção de alta sensibilidade sem contaminação do sinal de fluorescência pela luz de excitação (IMIOLEK, 2014). Os principais elementos de um microscópio de absorção de dois fótons são: laser de safira dopado com titânio de femtossegundo usado como fonte de luz, tubos fotomultiplicadores para detecção de fluorescência e várias partes da óptica de microscopia (*scanner* acionado por galvanômetro, espelho dicróico, objetiva, entre outros). Utilizando essa instrumentação, pode-se obter fotografias de excitação de células marcadas com diferentes corantes (RUMI & PERRI, 2010; IMIOLEK, 2014). Neste trabalho, a microscopia por absorção de dois fótons foi utilizada para se obter mais informações a respeito do tecido em análise, uma vez que a eosina é o principal corante que pode ser excitado em tecidos corados com H&E.

3. HIPÓTESE

O comportamento tumoral e os parâmetros clínico-patológicos das neoplasias mamárias estão correlacionados com a arquitetura e orientação das fibras colágenas determinadas a partir de imagens obtidas por geração de segundo harmônico, uma vez que há diferenças entre o colágeno de mamas normais e neoplásicas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar o comportamento tumoral e os parâmetros clínico-patológicos dos principais tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas com a arquitetura e orientação das fibras colágenas a partir de imagens obtidas por geração de segundo harmônico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a arquitetura e orientação das fibras colágenas em mama normal, neoplasias mamárias benignas, malignas *in situ* e malignas invasoras em cadelas;
- Avaliar a arquitetura e orientação das fibras colágenas em regiões epiteliais benignas e malignas (*in situ* e invasoras) no carcinoma em tumor misto em cadelas;
- Correlacionar as alterações de arquitetura e orientação das fibras colágenas dos carcinomas mamários caninos com o subtipo histológico, grau histológico, estadiamento clínico e proliferação celular;
- Correlacionar as alterações de arquitetura e orientação das fibras colágenas carcinomas mamários caninos com a sobrevida das cadelas.

5. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tópicos material e métodos, resultados e discussão serão apresentados nesta sessão sob a forma de um artigo científico elaborado durante o mestrado. O artigo será submetido à revista *Scientific Reports* e está formatado segundo as normas desta revista.

Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival rate based on collagen fibre characteristics

Ana P. V. Garcia¹, Luana A. Reis², Fernanda C. Nunes¹, Francis G. J. Longford³, Jeremy G. Frey³, Ana M. de Paula^{2,*}, and Geovanni D. Cassali^{1,*}

¹Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

²Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil

³University of Southampton, Southampton SO17 1BJ, United Kingdom

*ana@fisica.ufmg.br, cassalig@icb.ufmg.br

ABSTRACT

Early diagnosis is key in prevention and reduction of morbidity and mortality in all types of cancers. Here we show that changes in the collagen fibres in the main histological subtypes of canine mammary gland carcinomas correlate with the tumour behaviour and the animal survival rate and can be a useful tool in helping with diagnosis. Imaging by second harmonic generation and fluorescence multiphoton microscopy were performed to extract the collagen and cell parameters in cancer biopsies. We analysed 950 biopsies regions including normal mammary gland tissue, benign mixed tumours, carcinoma in mixed tumour, carcinosarcoma, micropapillary carcinoma and solid carcinoma. The image analysis and the comparison between the tumour types allowed to assess the collagen fibre changes during tumour progression. We demonstrate that the collagen parameters correlates with the clinical and pathological data, the results show that in neoplastic tissues, the collagen fibres are more aligned and shorter as compared to the normal tissues. There is a clear correlation of the mean fibre length with the dogs survival rate, female dogs diagnosed with advanced stage carcinoma that present shorter collagen fibres have a worse survival rate than animals with early stage carcinomas presenting longer fibres.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer among women - with the exception of non-melanoma skin cancer - corresponding to about 25% of new cases each year worldwide. In Brazil, this rate is even higher, reaching 29%, according to the National Cancer Institute.¹ Thus it is of great importance for public health, motivating studies on prevention and early diagnosis, in the search for the reduction of morbidity and mortality related to this neoplasm.² The subject is also of great interest in Veterinary Medicine, mainly due to the high prevalence of malignant neoplasms in female dogs, largely a reflection of late diagnosis, which compromises treatment and reduces the survival rate of the animals.³⁻⁵ In addition, mammary neoplasms in female dogs and women show epidemiological, clinical, biological and genetic similarities, which makes it possible to use the female dog as a comparative model.⁵⁻¹¹

It is known that breast neoplasms stimulate the degradation of components of the extracellular matrix. Collagen, specifically, undergoes significant structural changes in the presence of malignancy that plays an important role in modulating the behaviour of breast cancers.¹²⁻¹⁵ Changes in the collagen structural architecture have been used to successfully detect malignancies in the mammary gland.^{16,17} Collagen also plays a significant role in the emergence of metastases, with a considerable number of studies involving cancer prognosis and therapies,^{18,19} and specifically in breast cancer.^{17,20-28}

Recent studies indicate that there must be a balance between the magnitude of the traction forces and the adhesion force of the cell to the extracellular matrix to achieve an ideal process of cell migration.²⁹⁻³³ In a multicellular system, the tensile forces generated by individual cells can give rise to an evolving force network (supported by the fibres of the extracellular matrix). That is, there are forces that literally actively pull the individual cells in order to move them in the extracellular matrix and this force can be detected by distant cells³³. The mechanical coupling between the cells can influence the migration of individual cells, which could alter the structure and properties of the extracellular matrix and, therefore, the tensile strength network. This feedback loop between the strength of the extracellular matrix network and cell migration may be responsible for a wide range of collective migratory behaviour.²⁹⁻³³

Therefore, understanding the structure and functional properties of the collagen fibres is essential for understanding the

tumour behaviour in different types of neoplasms. The collagen is a non-centrosymmetric fibre that efficiently generates second harmonic signals, thus images obtained by nonlinear microscopy from second harmonic generation (SHG) have been shown to be a useful method to study these tissue changes. The SHG microscopy allows to obtain data regarding the morphology of the extracellular matrix of the breast, including the organization, shape and quantification of the collagen fibres that make up this matrix, characterizing the changes that occur in the fibres during tumour progression that facilitates the extravasation and migration of tumour cells.^{12–17,30,34,35}

Here we present results for multiphoton microscopy and image analysis that provide a range of collagen parameter measurements. We implemented a methodology to extract from the images the collagen fibre network and to measure the properties of the fibre and cell regions. We show that the changes in the collagen fibre length correlate with the tumoural behaviour and animal survival rate. Also, we demonstrate that the collagen parameters show a good separation of the main histological types of canine mammary neoplasms.

Results and Discussion

Details of the samples studied

The details of the histological subtypes analysed: the age of the patients, clinical stage, histological grade, molecular subtype, cell proliferation rate and survival rate are shown in table 1. The average age of the patients was 10 years. Among the 45 cases of mammary cancer evaluated, 36% were carcinoma in mixed tumour (CMT; $n = 16$), 26% solid carcinoma (SC; $n = 12$), 16% micropapillary carcinoma (MC; $n = 7$), 13% benign mixed tumour (BMT; $n = 6$) and 9% carcinosarcoma (CS; $n = 4$). In relation to the clinical staging, 44% of the carcinomas were classified with staging 4 ($n = 20$), 22% with staging 1 ($n = 10$), 18% with staging 3 ($n = 8$), 9% with staging 5 ($n = 4$) and 7% with staging 2 ($n = 3$). For the histological grade 36% of the cases were classified with histological grade II ($n = 16$), 33% with histological grade III ($n = 15$) and 18% with histological grade I ($n = 8$). Regarding the molecular subtype, 25% of the cases were classified as luminal A ($n = 10$), 67% as luminal B ($n = 26$) and 8% as triple negative ($n = 3$). Among the analysed cases, 60% had low cell proliferation rate (Ki67 $\leq 20\%$; $n = 27$) and 40% of the cases had a high cell proliferation rate (Ki67 $> 20\%$; $n = 18$). The average survival of the patients was 658 days for the ones diagnosed with BMT, 687 days for the CMT, 165 days for the CS, 152 days for the MC and 267 days for the SC.

Histological type	n(%)	Median years	Staging					Histological grades				Molecular subtype				Survival (days)
			I	II	III	IV	V	I	II	III	NA	HR+/Ki67 $\leq 20\%$	HR+/Ki67 $> 20\%$	HR-/HER2-	NA	
BMT	6 (13%)	9	4	2	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	NA
CMT	16 (36%)	10.6	4	1	4	7	0	8	8	0	0	8	7	1	0	687
CS	4 (9%)	9.3	0	0	3	0	1	0	0	4	0	0	3	1	0	165
MC	7 (16%)	11	0	0	0	5	2	0	4	3	0	1	6	0	0	152
SC	12 (26%)	10.2	2	0	1	8	1	0	4	8	0	1	10	1	0	267
Total	45 (100%)	10	10	3	8	20	4	8	16	15	6	10	26	3	6	317.75

Table 1. Clinicopathological features of canine mammary neoplasms. BMT= benign mixed tumour; CMT= carcinoma in mixed tumour; CS= carcinosarcoma; MC= micropapillar carcinoma; SC= solid carcinoma. NA= not available.

Images and extracted parameters

Figure 1 presents representative images of the histological mammary sections stained with hematoxylin and eosin (H&E), photoluminescence signal (PL), SHG and the extracted fibre network and cell regions obtained from the image analysis methodology. Details of the image measurements and analysis are described in the Material and Methods section.

The normal mammary gland, first column, presents acini and ducts consisting of luminous epithelial cells lined by myoepithelial cells that are separated from the surrounding connective tissue by the basement membrane.^{36,37} The collagen fibers, abundant in the surrounding connective tissue, are arranged in different directions throughout the mammary tissue. The mixed benign tumours (BMT), second column, are characterized by benign proliferation of cells morphologically similar to the epithelial (luminal or myoepithelial cells) and mesenchymal components that produce cartilage and/or bone and/or adipose tissue, possibly in combination with fibrous tissue³⁸. In these neoplasms, it is still possible to observe an abundance of collagen fibers in the surrounding connective tissue, however the fibers are more organized in relation to normal mammary tissue (first column). The mixed tumours, third column, exhibit a complex histological pattern, as they have components of epithelial and mesenchymal origin. Malignant epithelial cells exhibit an infiltrative growth, which can be identified by the loss of continuity of the basal/myoepithelial layer associated with clusters of tumour cells that penetrate the stroma. The occurrence

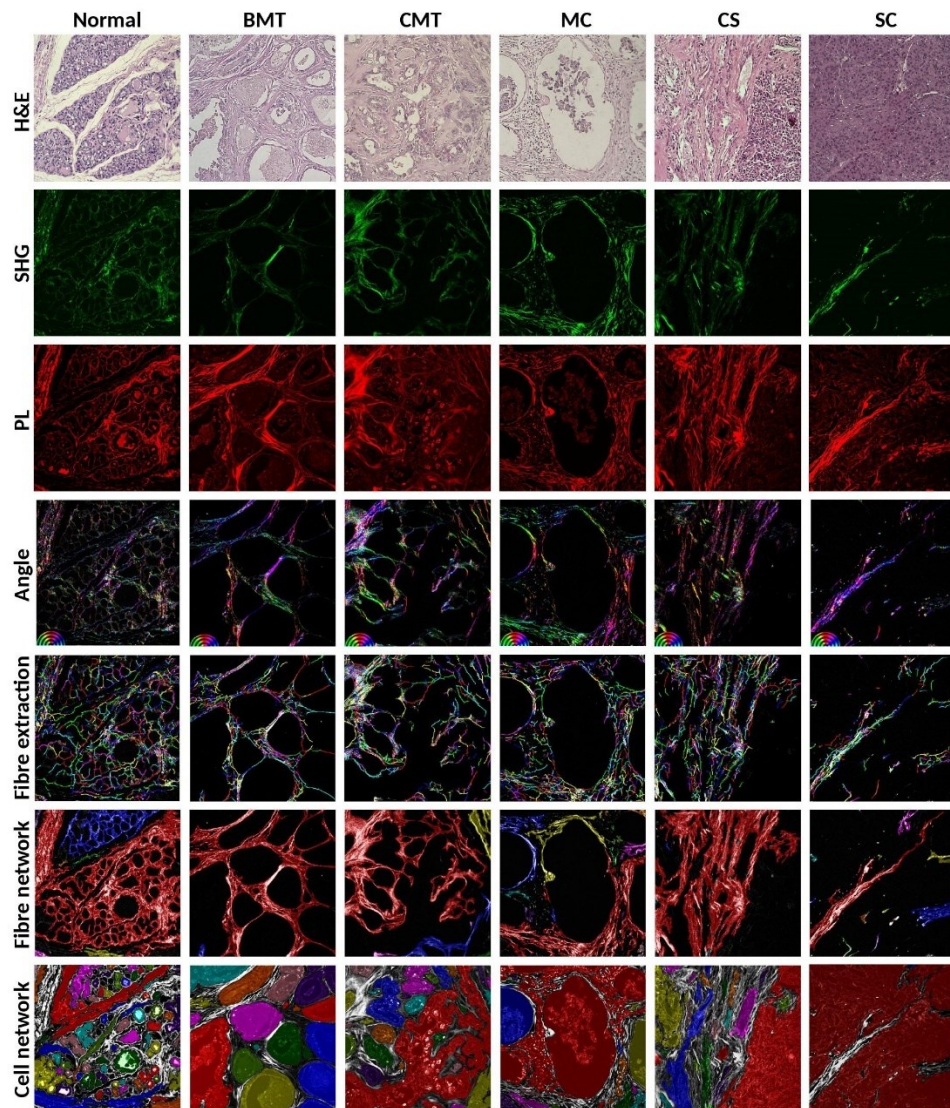


Figure 1. Measured images: the optical microscopy H&E (first row), SHG (second row), PL (third row) and the images extracted by the software: a color map image with the angle distribution of the collagen fibres in the tissue (fourth row, angle color map at the bottom left hand side), the fibre segments (fifth row), the fibre network (sixth row) and the cell segments (seventh row) for the normal mammary gland and each tumour type indicated in the columns as Normal, BMT, CMT, CS, MC, SC for the normal mammary gland, benign mixed tumour, carcinoma in mixed tumour, carcinosarcoma, micropapillary carcinoma and solid carcinoma, respectively. The images are 0.53 mm×0.53 mm with 512×512 pixels.

of non-invasive proliferation (*in situ*) can also be observed. The differentiation between *in situ* and invasive components in carcinomas in mixed tumours is possible due to the presence of stromal invasion and microinvasion. The areas of invasion are characterized by the presence of clusters of infiltrative tumour epithelial cells in the regions of periductal stroma close to the components of the carcinoma. Microinvasion is identified by *in situ* areas, small regions where there is a projection of neoplastic cells that break the basement membrane.³⁹ In these carcinomas, it is possible to observe a greater organization of collagen fibers that make up the surrounding connective tissue in relation to the benign mixed tumour (second column) and normal breast tissue (first column). It is possible to observe the alignment of the collagen fibers in the connective tissue that surrounds the neoplastic growth. The micropapillary carcinomas (MC), fourth column, exhibit well-defined cystic spaces similar to the lymphatic vessels diffusely distributed throughout the mammary gland. Within these cystic spaces there are clusters of epithelial cells with a micropapillary pattern called “moruliform”, with abundant eosinophilic cytoplasm, evident nuclear pleomorphism and prominent nucleoli.³⁹ In these carcinomas, it is also possible to notice the orientation of the collagen fibers in a preferred direction, indicating greater organization of the surrounding connective tissue in relation to normal mammary tissue (first column) and the benign mixed tumour (second column). The histological characteristics of the carcinosarcomas (CS), fifth column, are extremely variable and were previously described as mixed malignant tumours of the mammary gland. They are composed of malignant epithelial and mesenchymal cells³⁹ and show an abundance of connective tissue. In the solid carcinoma (SC), sixth column, there is a proliferation of epithelial cells organized in a solid arrangement, with the formation of cords, sheets or agglomerates. The tumour cells are undifferentiated, exhibit small hyperchromatic nuclei and the mitotic index is high. The amount of stroma can vary from small to moderate and areas of necrosis are frequently observed.³⁹ As in the other carcinomas, in the solid carcinoma it is also possible to observe greater organization of the collagen fibers of the surrounding connective tissue in relation to normal breast tissue (first column) and the benign mixed tumour (second column).

The image analysis procedure and the extracted fibre and cell network allowed the quantification of many of the image visual characteristics described above. The measured parameters: the collagen fibre anisotropy (SHG anisotropy), the local SHG anisotropy, the number of collagen fibres, the mean fibre length, the image area covered by fibre (fibre segment coverage) and by cell (cell segment coverage) for the normal mammary tissues (NMT) and in the neoplastic mammary tissues are shown in Figure 2 as boxplots. The statistical correlations between the histological types are shown in the Table 2. For the SHG anisotropy parameter, Figure 2(A) the data shows that in all histological types the collagen fibres are more aligned as compared to the NMT and it provides a clear separation between normal and neoplastic tissue. These findings corroborate with others described in the literature.^{16, 17, 20–28, 40–43} For the local SHG anisotropy parameter, Figure 2(B), only the BMT shows higher values as compared to the NMT. The local anisotropy measurements are made in small regions of the image, thus this indicate that in the BMT, the collagen fibres that are abundant in these tissues,^{8, 4 4–46} are more organized at this stage of tumour progression. The *p*-values shows statistically significant correlations between all histological types, except for the CMT×NMT and the MC×CS.

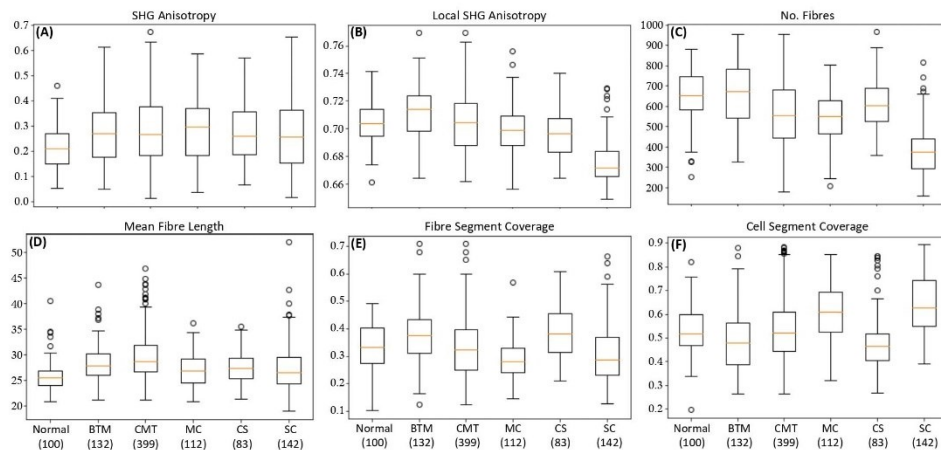


Figure 2. Boxplot graphics showing the calculated parameters for the fibre and cell segments, SHG anisotropy, local anisotropy, number of fibres, the mean fibre length and the image area covered by fibre and cell: fibre segment coverage and cell segment coverage for all the tumour types studied.

	NMT × BMT	NMT × CMT	NMT × MC	NMT × CS	NMT × SC	BMT × CMT	BMT × MC	BMT × CS	BMT × SC	CMT × MC	CMT × CS	CMT × SC	MC × CS	MC × SC	CS × SC
SHG Anisotropy	***	***	***	**											
Local SHG Anisotropy	**		*	**	***	***	***	***	***	*	**	***		***	***
No. Fibres		***	***		***	***	***	*	***		**	***	***	***	***
Mean Fibre Length	***	***	**	***	**	**	**	*	*	***	***	***			
Fibre Segment Coverage	***		***	***		***	***		***	***	***		***	*	***
Cell Segment Coverage	*		***	*	***	***	***		***	***	**	***	***		***

Table 2. p value significance: $p < 0.05$ are denoted as *, $p < 0.01$ are denoted as ** and $p < 0.001$ are denoted as ***. Empty table cells denote not significant p . NMT= normal mammary tissue; BMT= benign mixed tumour; CMT= carcinoma in mixed tumour; CS= carcinosarcoma; MC= micropapillary carcinoma; SC= solid carcinoma.

The number of fibres and fibre length are two important parameters to assess the changes of the collagen in neoplastic tissues. The number of fibres, figure 2(C) shows that the amount of collagen decreases in the neoplastic tissues as compared to the NMT except for the BMT, due to the large amount of extracellular matrix characteristic of this histological type.^{8,44-46} However, the fibres are longer in the neoplastic tissue, figure 2(D). Nonetheless, between the tumour types the collagen fibres show a shorter length in MC, CS and SC as compared to the BMT and CMT. These results lead to the hypothesis that within the tumour types, the less aggressive mammary cancers present longer collagen fibres than the more aggressive mammary tumours. These two parameters show statistically significance between most of the histological types, table 2.

For the parameters, fibre segment coverage and cell segment coverage, shown in figure 2(E-F) and table 2, it is observed that the BMT and CS show a higher amount of collagen and less cells, corroborating with studies that used other methodologies.^{8,44-46} In addition, the results show a larger area covered by cells in the SC as compared to other histological types in agreement with the characteristic of solid carcinomas that show an expansive growth in highly cellularized nests.⁴⁴ For the comparisons between the histological types, the BMT presented a larger area covered by fibres in comparison to the samples of the other histological subtypes.^{8,44,45} These parameters also show statistically significance between most of the histological types, table 2.

Changes in the collagen parameters and tumour progression

The results obtained for the SHG anisotropy, local SHG anisotropy, number of fibres, collagen fibre length, fibre coverage and cell coverage in NMT and CMT are presented in figure 3. It is shown the comparisons between the normal mammary gland (normal) and the benign areas (CMTb), and the malignant *in situ* (CMTis) and malignant invasive regions (CMTi) of the CMT. The statistical data are shown in table 3. For the SHG anisotropy parameter, figure 3(A), the results show that the collagen fibres are more aligned in the benign, the malignant *in situ* and the malignant invasive regions of the CMT in comparison to the normal mammary gland.^{40-43,45,46} For the local anisotropy, figure 3(B), it can be seen that the benign and malignant invasive areas of the CMT show more aligned collagen fibres in comparison to NMT. The comparisons between the types show that the collagen fibres are more aligned in the malignant *in situ* and the malignant invasive regions in comparison to benign areas. In addition the malignant invasive areas shows more aligned collagen fibres in comparison to malignant *in situ* areas. These results support the hypothesis described earlier indicating that collagen fibres are still scattered in the benign tissue.^{8,44,45}

For the number of fibres, the data presented in figure 3(C) and table 3 show that the benign areas (CMTb) present slightly larger amount of fibres than the NMT. The malignant areas *in situ* and invasive malignant areas of the CMT present less fibres in comparison to the NMT. It should be noted that in the malignant *in situ* areas the collagen is even less than in the benign and malignant invasive areas. Figure 3(D) and table 3 show that collagen fibres are longer in CMTb, CMTis and CMTi than in the normal mammary tissue. Therefore, it is possible to say that during tumour progression the collagen fibres become more aligned and larger as the neoplasia develops. However, in the malignant invasive regions the fibres decrease in comparison to the malignant *in situ* regions, but the values do not return to the levels presented in the NMT. These two parameters show statistically significance between most of the histological types and are good indicators of tumour progression, table 3. Several studies describe that neoplastic cells influence and are influenced by the extracellular matrix and the tumour microenvironment during tumour progression, in order to invade underlying tissues.^{11,29-33,47-49} Thus, as explained earlier, we believe that while neoplastic cells express a growth profile *in situ* the collagen fibres are larger and more stretched, limiting neoplastic growth.

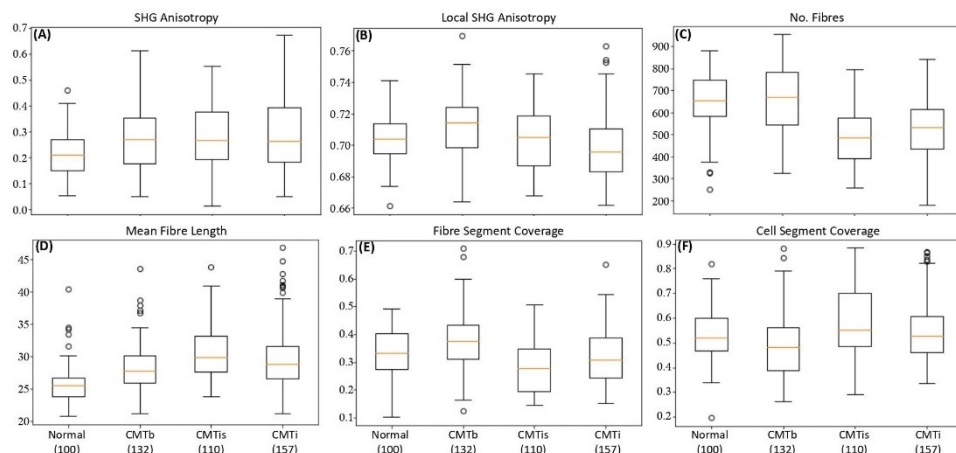


Figure 3. Boxplot graphics showing the collagen calculated for the whole fibre segments and average of the SHG anisotropy, local SHG anisotropy, the fibre waviness, the fibre length and the fibre coverage and cell coverage for the normal mammary gland (normal) and the benign areas (CMTb), and the malignant *in situ* (CMTis) and malignant invasive regions (CMTi) of the CMT.

	NMT × CMTb	NMT × CMTis	NMT × CMTi	CMTb × CMTis	CMTb × CMTi	CMTis × CMTi
SHG Anisotropy	***	***	***			
Local SHG Anisotropy	**		**	**	***	*
No. Fibres		***	***	***	***	
Mean Fibre Length	***	***	***	***	*	*
Fibre Segment Coverage	***	***		***	***	***
Cell Segment Coverage	**	***		***	***	***

Table 3. p value significance: $p < 0.05$ are denoted as *, $p < 0.01$ are denoted as ** and $p < 0.001$ are denoted as ***. Empty table cells denote not significant p . NMT= normal mammary gland; CMTb= benign areas of carcinoma in mixed tumour; CMTis= *in situ* areas of carcinoma in mixed tumour; CMTi= invasive areas of carcinoma in mixed tumour.

However, when these cells break the basal membrane and express an invasive profile, the fibres become more fragmented and smaller in relation to the previous state.

Cell migration in the extracellular matrix is a complex dynamic process that involves a series of cellular and extracellular activities, including the development of lamellipodia, formation of focal adhesion sites, locomotion through actin contraction and cell fixation.^{29–33} Cellular migration involves integration into a complex microenvironment, which can be a physiological or pathological process, including regeneration tissues, immune response and tumor progression.^{11,29–33,47–49} In addition to well-established chemotaxis, the microstructure and physical properties of the extracellular matrix have a significant influence on cell migration via durotaxis, haptotaxis and contact orientations^{11,47–49}. A migrating cell also generates active traction forces that are transmitted to the fibres of the extracellular matrix through complex foci of adhesion. These active forces reshape the local extracellular matrix, redirecting the collagen fibres and forming bundles that increase the local stability of the extracellular matrix.^{30–33,47} Durotaxis can be explained as a unidirectional cell migration mechanism in which a cell responds to an extracellular gradient of rigidity, which is important in the process of cell migration and invasion in tumour progression. During durotactic migration, there is usually cellular movement towards regions of increasing stiffness on increasingly rigid substrates.^{29–33} The mechanisms proposed to support the mesenchymal cell durotaxis hypothesis include contractile mechanical detection, probing of the local substrate by lamellipodia and signaling of focal adhesion.^{31–33}

For the parameters fibre coverage and cell coverage, the results presented in figure 3(E-F) and table 3 show that the benign

areas of the CMT have a smaller fibre coverage area compared to NMT and malignant *in situ* and invasive areas. Thus, the benign areas also show larger cell coverage in comparison to the NMT and the malignant *in situ* and invasive areas of CTM. These results indicate that, possibly, in the initial phase of tumour progression, cell proliferation is more pronounced in relation to the proliferation of collagen fibres. However, during tumour progression, changes in the neoplastic cells and in the tumour microenvironment stimulate the proliferation of collagen fibres, which at this stage are more organized and aligned.^{11,29-33,47-49} Thus, the results presented highlight the importance of the collagen fibres and the extracellular matrix during tumour progression.

Carcinomas with worse prognosis present smaller fibres

Figure 4 shows the correlation between the collagen fibre length in the CMT, CS, MC and SC and the data of the cell proliferation, histological grading and histological subtype. All the correlations show that the carcinomas with worse prognosis present shorter collagen fibres. The cell proliferation are indicated by 1 for the high cell proliferation and 0 for low cell proliferation. The histological grade is presented as 0 for carcinomas classified with histological grade I, 1 for carcinomas classified with histological grade II and 2 for those classified with histological grade III. The histological grading correlation shows that the carcinomas with a score of 2 and 1 have shorter collagen fibres as compared to carcinomas with a score of 0. The histological subtype is presented as 0 for carcinomas with a good prognosis (CMT) and 1 for carcinomas with a worse prognosis (CS, MC and SC).

The survival curve, figure 5(A), shows that the dogs diagnosed with CS reached the median survival in 54 days, the ones diagnosed with MC in 140 days, the SC in 252 days and the CMT in 824 days. Thus, it appears that CS, MC and SC are the most aggressive carcinomas and with the worst prognosis, corroborating with data presented in the literature.^{44,46,50} Correlating this information with the data presented in figure 3(C and D), it is possible to note that these carcinomas have shorter and less collagen fibres in comparison to the CMT. From this analysis, a cut-off point was established to determine whether the collagen fibre length parameter could be used as a clinical parameter complementary to the diagnosis of breast cancer. In the procedure the length values were grouped and organized to determine the median values and to establish a cutoff point. From the median fibre length (27.89), numbers 0 and 1 were assigned for the distribution of overall survivals: number 0 was assigned to dogs diagnosed with carcinomas presenting collagen fibre length less than or equal to 27.89 and number 1 was assigned to dogs diagnosed with carcinomas presenting collagen fibre with length larger than 27.89. Figure 5(b) shows that the dogs diagnosed with carcinomas presenting shorter collagen fibres (number 0) reach the median survival on the 150th day and dogs diagnosed with carcinomas with longer fibres (number 1) reach the median survival on the 511th day. Thus, the results clearly indicate that the more aggressive carcinomas and with unfavorable prognosis present shorter collagen fibres as compared to less aggressive carcinomas.

Finally, a multivariate analysis was performed to verify which variables could be correlated to the increased risk of the dog death. In a multivariate analysis on a model with the variables histological subtype, histological grade, clinical stage, estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, molecular subtype, cell proliferation index, clinical stage and mean fibre length only the histological subtype and clinical stage variables were included in the final model. An increased risk of death was observed in dogs diagnosed with carcinomas with stage IV and V (HR = 3.74, $p < 0.010$, confidence interval [CI] = 1.36-10.27) in comparison to the dogs diagnosed with tumour stages I-III and in dogs diagnosed with more aggressive histological subtypes

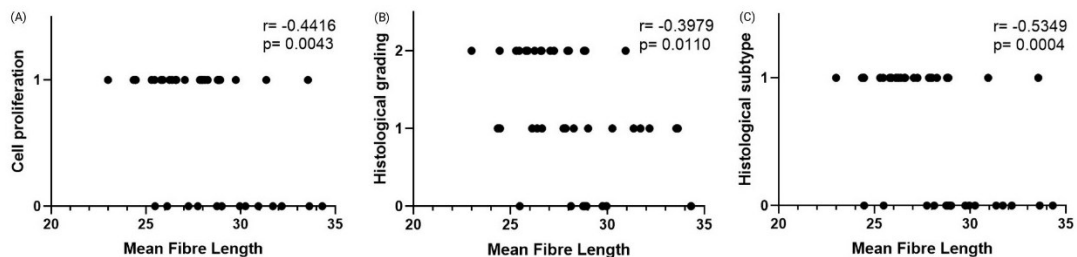


Figure 4. Plots of Spearman's correlations between the collagen fibre length and the cell proliferation, the histological grading and the histological subtype. (A) Correlation between the fibre length and the cell proliferation, where 1 indicates the high proliferation and 0 the low cell proliferation; (B) Correlation between the fibre length and the histological grading, where the carcinomas classified with histological grade I, II and III are represented by 0, 1 and 2, respectively; (C) Correlation between the fibre length and the histological subtype, where the subtype is presented as 0 for carcinomas with good prognosis (CMT) and 1 for carcinomas with worse prognosis CS, MC and SC)

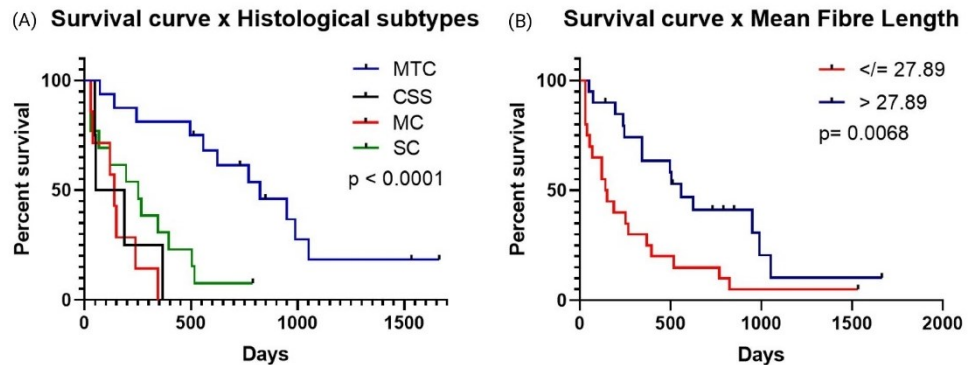


Figure 5. (A) Correlation between the survival rate and histological subtype, CMT = carcinoma in mixed tumour; CS = carcinosarcoma; SC = solid carcinoma; MC = micropapillary carcinoma. (B) Correlation between the survival rate and the collagen mean fibre length, the red line for fibre length $\leq 0.27.89$ and the blue line for fibre length $> 0.27.89$.

(HR = 11.35, $p < 0.0001$, confidence interval [CI] = 3.14-41.00]. The mean fibre length was not included in the final model because in the univariate risk analysis it presented $p = 0.06$. These results corroborate the previously presented hypothesis that carcinomas with an invasive growth profile and with a tendency to metastasize tend to have smaller fibres in comparison to carcinomas with an in situ and local growth profile.³⁰ As shown, there is an interaction between the cancer cells and the extracellular matrix in such a way that facilitates the process of tumour progression and invasion. Thus, these changes in the collagen fibre size in invasive tumour regions could be justified by the modifications that occur in the extracellular matrix during the cell invasion process.

Conclusion

In conclusion, the biopsy evaluation by the nonlinear microscopy technique and the image analyses allowed to demonstrate differences in the organization, number and length of the collagen fibres between neoplasms and normal mammary gland during tumour progression. It was also demonstrated that, among the subtypes of mammary carcinomas, the more aggressive carcinomas present shorter collagen fibres in comparison with the less aggressive ones that directly correlates with the dogs survival rates. These imaging and analyses may become complementary tools to help towards more precise cancer diagnostics.

Material and Methods

Second harmonic generation and photoluminescence imaging

The SHG and PL imaging system is a home built setup using an Olympus FV300 scanning laser microscope.³⁵ We used a 140 fs Ti-Sapphire oscillator (Coherent Chameleon) with 80 MHz repetition rate tuned to the wavelength of 800 nm. The circularly polarized laser beam passes through the scanning mirrors and through a dichroic mirror and is focused on the sample at normal incidence by a 20 \times objective lens (N.A. 0.90). The SHG backscattered signal is collected by the same objective and directed by a polarization-insensitive dichroic mirror (Semrock FF665-Di02) to the detector (a photomultiplier tube, PMT). A thin band pass filter (20 nm bandwidth, Chroma HQ400/20m-2p) centred at the SH wavelength (400 nm) a blocking edge filter (Semrock FF01-680/SP-25) are used to completely remove the laser scattered light. For the PL imaging the dichroic mirror is moved out of the beam and the backscattered signal follows the descanned path and is measured by the internal PMT of the confocal. The signal is filtered by a band pass filter in the range 560-600 nm and the blocking edge filter (Semrock FF01-680/SP-25). We collected SHG and PL images at the same sample position with areas of 0.53 mm \times 0.53 mm (512 \times 512 pixels). The laser transmission through the sample is also acquired as an image in a PMT positioned after the microscope condenser. The images were collected for three different focal planes, separated by 1 μ m. The acquisition of the three images allowed to assure the best focal position and they were also used by the software to eliminate noise.

We have measured 950 representative areas of the NMT and the other histological types, including about 10 to 15 areas for each type. On the histological slides in which normal breast regions were selected the measurements were taken in the 10 most representative areas of the tissue in the sections stained with H&E. For the BMT slides, 5 peri-tumour areas and 5 intra-tumour areas were selected for measurements. The peri-tumour regions are defined from the fibrous tissue at the edges of the tumour,

in the transition to the unchanged tissue; the intra-tumour regions correspond to areas with collagen within groups of cells with neoplastic growth. In the remaining cases, 10-15 most representative intra-tumour regions were selected for the measurements. The images from these selected areas were collected for analysis.

Biopsies: Case selection

We present a retrospective study of 45 cases of canine mammary cancer and 12 samples of healthy mammary gland regions as control samples. We included the samples that contained the information on clinical staging, histological graduation, molecular subtype and cell proliferation. The samples were obtained from the Laboratory of Comparative Pathology at Federal University of Minas Gerais, Brazil. The materials used for the imaging were the standard histological slides stained with H&E, from fragments of neoplasms fixed in formalin and embedded in paraffin. The tissues were obtained from biopsies of simple mastectomy, regional mastectomy, unilateral or bilateral radical mastectomy depending on the tumour size, clinical staging, lymphatic drainage and tumour location. The selected samples were collected from the years 2009 to 2019 and they were classified according to the criteria described in the Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors,⁴⁴ including the types: 12 NMT, 06 BMT, 16 CMT, 04 CS, 07 MC and 12 SC. All cases were reviewed in sections stained with H&E by an experienced pathologist specialized in canine mammary gland cancer. Clinical staging was performed based on tumour size (T), neoplastic involvement of regional lymph nodes (N) and presence of distant metastases (M) according to the TNM system established by the World Health Organization (WHO), modified by Owen, for canine mammary tumours.⁵⁰ The histological grade was established according to the Nottingham system. For the correlations with the survival data, the patients included were the ones treated with surgery only. The score 1 was used for those who died due to mammary carcinoma and 0 for the ones alive or those who died due to other causes.

The study was performed in view of the fundamental ethical principles in the Helsinki Declaration (approved by the "Ethics Committee on the Use of Animals at UFMG, under number 251/2018).

Image analysis

Quantitative analysis of the parameters of collagen fibres and cells were obtained using a software package named PyFibre (Python Fibrous Image Analysis Toolkit) that perform an image segmentation into collagen and cell regions and extract their parameters (available on GitHub⁵¹). The PyFibre generates a database with all the metrics extracted from the images for the analysis of the collagen fibres and cells. The values of the metrics evaluated are used as comparison parameters for normal tissues and the neoplastic tissue. The measurements of the total anisotropy characterize the organization of collagen fibres as purely isotropic regions (value 0) and regions in which the collagen fibres are perfectly aligned, or anisotropic (value 1). The local anisotropy parameter is the average of the anisotropy for image areas of 3×3 pixels in the collagen regions, that is also defined from 0 (isotropic) to 1 (anisotropic). The extracted collagen fibre network allows to measure also the number of fibres and the fibre length (in pixels). The fibre coverage area and cell coverage area parameters are the image percentage covered by the fibre and cell segments, respectively. The calculations are made specifically for the cell and fibre regions extracted from the image segments.

Immunohistochemistry

Histological sections of 4 μm thickness were prepared for immunohistochemistry reactions. A commercial anti-mouse/anti-rabbit detection kit (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, United Kingdom) was used according to the manufacturer's instructions. For the recovery of antigens from estrogen receptors (RE), progesterone (PR), Ki67 and HER2, steam heat (Pascal) with citrate pH 6.0 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Denmark). The slides with the histological sections were incubated with the appropriate primary antibody for 16 hours in a humid chamber at 4°C (1:50, clone 1D5, Dako), PR (1:50, hPRa2 clone, Neomarkers, Fremont, CA, USA), HER2 (1: 200, polyclonal, Dako) and Ki67 (1:50, MIB-1 clone, Dako). Immunoreactivity was visualized with the 3'-diaminobenzidine chromogen (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, USA) and contrasted with Mayer's hematoxylin. Samples of breast tissue fragments from women positive for RE, RP, HER-2 and Ki67 were used as positive controls of the reactions. For negative controls, the primary antibody was replaced with phosphate buffered saline (PBS). The analysis of the slides, quantification of immunoreactions and the classification of immunophenotypes were performed according to Nunes *et al.*⁵².

Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare means between the diagnostic groups and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The p values less than 0.001 are denoted by (***) , p less than 0.01 are denoted by (**) and p less than (0.05) are denoted by (*).

For the correlation analysis between the evaluated variables, the Spearman Rank Correlation Coefficient statistical test was used. For all analyses, a value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. These analyses were performed using the Microsoft Windows software, Prism (version 7.0, GraphPad, San Diego, CA, United States). The prognostic value of the

different clinical-pathological variables was determined in patients treated with surgery only, based on an initial univariate analysis to assess overall survival rate according to the immunophenotype. The overall survival rate was estimated using the Kaplan-Meier curve and the comparisons between groups were performed using the Mantel-Cox log rank test. Then, a multivariate analysis was performed using the Cox regression model to estimate the risk ratio considering the variables with $p < 0.05$ in the univariate analysis. In Cox's final model, only variables with $p < 0.05$ were maintained in the model. The multivariate analysis was performed using the Stata software version 14.0 (SatataCorp, College Station, TX, USA).

References

1. Institute of cancer, Brazil, <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Accessed April 24th, 2020.
2. Sun, Y. S. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences* **13**, 1387–1397 (2017). DOI 10.7150/ijbs.21635.
3. Nunes, F. *et al.* Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **70**, 1714–1722 (2018). DOI 10.1590/1678-4162-10217.
4. Andrade, F. H., Figueiroa, F. C., Bersano, P. R., Bissacot, D. Z. & Rocha, N. S. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* **5**, 45 (2010).
5. Estrela-Lima, A. *et al.* Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* **10**, 256 (2010).
6. Cassali, G. D. Comparative mammary oncology: canine model. In *BMC Proceedings*, vol. 7, K6 (Springer, 2013).
7. Cassali, G. D. *Canine Mammary Tumors - from diagnosis to treatment (English Edition)* (MedVet, Rio de Janeiro, 2020).
8. Misdorp, W. *Tumors of the Mammary Gland*, chap. 12, 575–606 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
9. Uva, P. *et al.* Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* **10**, 135 (2009).
10. Rivera, P. & Von Euler, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology* **48**, 132–146 (2011).
11. Markkanen, E. Know thy model: Charting molecular homology in stromal reprogramming between canine and human mammary tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7**, 348 (2019).
12. Ajeti, V. *et al.* Structural changes in mixed col i/col v collagen gels probed by shg microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer. *Biomedical Optics Express* **2**, 2307–2316 (2011).
13. Golaraei, A. *et al.* Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy. *Biomed. Opt. Express* **7**, 4054–4068 (2016). URL <http://www.osapublishing.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-7-10-4054>. DOI 10.1364/BOE.7.004054.
14. Provenzano, P. P. *et al.* Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Medicine* **6**, 11 (2008).
15. Tan, W. J. *et al.* Second harmonic generation microscopy is a novel technique for differential diagnosis of breast fibroepithelial lesions. *Journal of Clinical Pathology* **68**, 1033–1035 (2015).
16. Falzon, G., Pearson, S. & Murison, R. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer. *Physics in Medicine & Biology* **53**, 6641 (2008).
17. Case, A. *et al.* Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. *PLOS ONE* **12**, 1–19 (2017). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180448>. DOI 10.1371/journal.pone.0180448.
18. Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M. & Lopez-Otin, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 411–424 (2004).
19. Desa, D. E. *et al.* Second-harmonic generation directionality is associated with neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer core needle biopsies. *Journal of Biomedical Optics* **24**, 086503 (2019).
20. Hompland, T., Erikson, A., Lindgren, M., Lindmo, T. & de Lange Davies, C. Second-harmonic generation in collagen as a potential cancer diagnostic parameter. *Journal of Biomedical Optics* **13**, 054050 (2008).
21. Tuer, A. E. *et al.* Nonlinear optical properties of type I collagen fibers studied by polarization dependent second harmonic generation microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* **115**, 12759–12769 (2011).

22. Burke, K., Tang, P. & Brown, E. B. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. *Journal of Biomedical Optics* **18**, 031106 (2012).
23. Brabrand, A. *et al.* Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. a premise for tumour invasiveness? *APIMIS* **123**, 1–8 (2015).
24. Hall, M. S. *et al.* Fibrous nonlinear elasticity enables positive mechanical feedback between cells and ECMs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 14043–14048 (2016).
25. Burke, K. *et al.* Using second harmonic generation to predict patient outcome in solid tumors. *BMC Cancer* **15**, 929 (2015).
26. Barcus, C. E. *et al.* Elevated collagen-i augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells. *Breast Cancer Research* **19**, 1–13 (2017).
27. Conklin, M. W. *et al.* Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *The American Journal of Pathology* **178**, 1221–1232 (2011).
28. Wang, H. & Qian, X. Giant optical second harmonic generation in two-dimensional multiferroics. *Nano Letters* **17**, 5027–5034 (2017).
29. Moriyama, K. & Kidoaki, S. Cellular durotaxis revisited: initial-position-dependent determination of the threshold stiffness gradient to induce durotaxis. *Langmuir* **35**, 7478–7486 (2018).
30. Zhang, K. *et al.* The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes snail1 to facilitate breast cancer metastasis. *Nature Cell Biology* **15**, 677–687 (2013).
31. Friedl, P. & Bröcker, E.-B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 41–64 (2000).
32. DuChez, B. J., Doyle, A. D., Dimitriadis, E. K. & Yamada, K. M. Durotaxis by human cancer cells. *Biophysical Journal* **116**, 670–683 (2019).
33. Ebata, H., Moriyama, K., Kuboki, T. & Kidoaki, S. General cellular durotaxis induced with cell-scale heterogeneity of matrix-elasticity. *Biomaterials* **230**, 119647 (2020).
34. Tilbury, K. & Campagnola, P. J. Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. *Perspectives in Medicinal Chemistry* **7**, 21–32 (2015).
35. Garcia, A. M. *et al.* Second harmonic generation imaging of the collagen architecture in prostate cancer tissue. *Biomedical Physics & Engineering Express* **4**, 025026 (2017).
36. Liu, D. *et al.* Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer research* **74**, 5045–5056 (2014).
37. Santos, A. & Matos, A. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours. part 2: Invasion, angiogenesis, metastasis and therapy. *The Veterinary Journal* **205**, 144–153 (2015).
38. Misdorp, W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals second series* **7**, 1–59 (1999).
39. Cassali, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* **10**, 87–99 (2014).
40. Rezakhaniha, R. *et al.* Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **11**, 461–473 (2012).
41. Ávila, F. J. & Bueno, J. M. Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues. *Applied Optics* **54**, 9848–9854 (2015).
42. Natal, R. A. *et al.* Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. *Tumor Biology* **40**, 1010428318770953 (2018).
43. Natal, R. A. *et al.* Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer. *Scientific Reports* **9**, 7715 (2019).
44. Abadie, J. *et al.* Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Research and Treatment* **167**, 459–468 (2018).
45. Dantas Cassali, G. *et al.* Canine mammary mixed tumours: a review. *Veterinary Medicine International* **2012**, 1–7 (2012).

46. 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. *Histology and Histopathology: Cellular and Molecular Biology* **31**, 675–688 (2016).
47. Hill, B. S., Sarnella, A., D'Avino, G. & Zannetti, A. Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer. In *Seminars in Cancer Biology*, vol. 60, 202–213 (Elsevier, 2020).
48. Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H. & Hass, R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Communication and Signaling* **9**, 1–8 (2011).
49. Guo, S. & Deng, C.-X. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *International Journal of Biological Sciences* **14**, 2083 (2018).
50. Owen, L. N. & World Health Organization. Veterinary Public Health Unit and WHO Collaborating Center for Comparative Oncology. TNM classification of tumours in domestic animals, edited by L.N. Owen (1980).
51. Longford, F. G. Pyfibre: Python fibrous image analysis toolkit. <https://github.com/franklongford/PyFibre>, Version 2, (2020).
52. Nunes, F. C. *Identificação de fenótipos moleculares e sua relação com fatores clínico-patológicos, tratamento e sobrevida em neoplasias mamárias caninas*. Ph.D. thesis, Doutorado em Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (2019).

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Author contributions statement

A.M.dP. and L.A.R conceived the nonlinear imaging experiments and performed the image analysis, G.D.C. and A.P.V.G conceived the case selection, L.A.R and A.P.V.G conducted the nonlinear imaging experiments, F.C.N. performed the immunohistochemistry experiments, A.P.V.G. and F.C.N. performed the survival data analysis, F.G.J.L. wrote the image analysis software and helped with the analysis, A.P.V.G, G.D.C., L.A.R and A.M.dP. analysed the results and wrote the manuscript. All authors discussed the results and reviewed the manuscript.

Additional information

The authors declare no competing financial interests.

6. CONCLUSÕES

- As fibras colágenas apresentam maior organização em neoplasias mamárias benignas em relação à mama normal. Nesse estágio da progressão tumoral as fibras ainda estão espalhadas no tecido, mas apresentam-se mais lineares.
- As fibras colágenas estão mais organizadas em neoplasias mamárias malignas *in situ* e invasoras em relação à mama normal. As fibras organizam-se em regiões específicas do tecido e estão mais lineares.
- As fibras colágenas apresentam maior organização nas regiões benignas, malignas *in situ* e malignas invasoras do carcinoma em tumor misto em relação à mama normal.
- Durante a progressão tumoral, avaliada no carcinoma em tumor misto, é possível observar que nas regiões malignas *in situ* as fibras colágenas apresentam-se maiores em relação às fibras das regiões malignas invasoras.
- Carcinomas com pior prognóstico apresentam fibras colágenas menores.
- Neoplasias com menor sobrevida apresentam fibras colágenas menores.
- Um risco aumentado de óbito foi observado em cadelas diagnosticadas com carcinomas com estadiamento IV e V (HR = 3.74, $p < 0.010$, intervalo de confiança [IC] = 1,36-10.27) em relação àquelas com tumores com estadiamento I-III.
- Um risco aumentado de óbito foi observado em cadelas diagnosticadas com subtipos histológicos mais agressivos (HR = 11.35, $p < 0.0001$, intervalo de confiança [IC] = 3.14-41.00)
- O tamanho médio da fibra não foi incluso no modelo final porque na análise de risco univariada $p=0.06$. Trabalhos futuros incluindo maior número de amostras serão realizados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A matriz extracelular exerce um papel fundamental durante a progressão tumoral, sendo essencial no processo de rompimento da membrana basal pelas células tumorais e na disseminação dessas células para locais distantes do sítio inicial de crescimento. A rigidez da matriz, alcançada, principalmente, pela deposição de fibras colágenas, aumento da densidade dessas fibras e sua maior organização na mama neoplásica em comparação com a mama saudável é essencial nos processos de invasão e metastatização. Estudos sugerem que essas características são importantes porque uma das principais formas de migração celular durante a progressão tumoral é a durotaxia. Nesse tipo de migração, as células tumorais são direcionadas pelo aumento da rigidez da matriz extracelular e, dessa forma, conseguem romper a membrana basal e alcançar sítios diferentes dos locais onde iniciaram o crescimento neoplásico.

A microscopia por geração de segundo harmônico e a microscopia por absorção de dois fótons têm sido amplamente utilizadas no estudo de neoplasias, principalmente neoplasias mamárias. Neste trabalho, essa metodologia foi capaz de fornecer novas informações para o entendimento das neoplasias mamárias em cadelas, especialmente em relação à progressão tumoral. Os dados mostraram que as fibras colágenas estão mais organizadas e alinhadas em tecidos neoplásicos quando comparados com tecidos normais. Forneceram subsídios, ainda, para mostrar a importância dessas fibras e da matriz extracelular na modulação do comportamento e progressão tumorais. As correlações estabelecidas entre os parâmetros de fibras colágenas e os dados clínico-patológicos, como grau histológico, estadiamento clínico, proliferação celular, subtipo molecular e sobrevida das cadelas incluídas no estudo mostraram que carcinomas mais agressivos e com prognósticos desfavoráveis apresentam fibras colágenas menores em relação aos carcinomas menos agressivos. Além disso, foi possível estabelecer um ponto de corte para o tamanho médio das fibras quando estes são correlacionados com a sobrevida das cadelas.

Estudos têm revelado uma correlação entre uma alta densidade de macrófagos associados ao tumor e um prognóstico ruim para diferentes neoplasias. Estes dados são evidentes para os casos de câncer de mama, próstata, ovário, cervical, endometrial, esofágico e de bexiga. Além disso, estudos mostraram que as concentrações aumentadas de MMP-2 e MMP-9 em neoplasias mamárias estão associadas a pior prognóstico (UENO *et al.*, 2000; WYCKOFF *et al.*, 2004; GOSWAMI *et al.* 2005; MARTINS *et al.*, 2019). Os dados mostram o aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 em mulheres com câncer de mama com metástase

linfonodal em comparação à expressão dessas metaloproteinases em mulheres com câncer de mama sem metástase linfonodal (MARTINS *et al*, 2019). Assim, como continuação deste trabalho, pretende-se correlacionar os dados encontrados até o momento com a infiltração de macrófagos no microambiente tumoral e com à alta expressão das metaloproteinases 2 e 9 e pentraxina 3 em carcinomas mamários caninos e humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Res Treat.** v. 167, n. 03, p. 637-648. 2002.

AJETI, V et al. Structural changes in mixed Col I/Col V collagen gels probed by SHG microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer. **Biomed Opt Express.** v. 2, n. 8, p. 2307. 2011.

ANDRADE, FHE et al. Malignant mammary tumor in female dogs: Environmental contaminants. **Diagn Pathol.** v. 5, n. 1. 5p. 2010.

AULER, P. et al. Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. **Vet Q,** v. 31, n. 4, p. 173-7, Dec 2011.

ÁVILA, FJ & BUENO, JM. Analysis and quantification of collagen organization with the structure tensor in second harmonic microscopy images of ocular tissues. **Appl Opt.** v. 54, n. 33, p. 9848–54. 2015.

BARCUS, CE et al. Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells. **Breast Cancer Res.** v. 19, p. 1–13. 2017.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Aust Vet J,** v. 89, n. 8, p. 312-7, Aug 2011.

BRABRAND, A et al. Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. A premise for tumour invasiveness? **Apmis.** v. 123, p. 1–8. 2015.

BUNDESAMT FÜR STATISTIK. Schweizerischer Krebsbericht. Disponível em: [www.bfs.admin.ch. https://www.bfs.admin.ch/bfs/de/home/statistiken/kataloge-datenbanken/medienmitteilungen.assetdetail.40064.html](https://www.bfs.admin.ch/bfs/de/home/statistiken/kataloge-datenbanken/medienmitteilungen.assetdetail.40064.html). 2015.

BURSTEIN, H. J. et al. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. **N. Engl. J. Med.** v. 350, p. 1430–1441. 2004.

BURKE, K et al. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. **J Biomed Opt.** v. 18, n. 3. 2012.

BURKE, K et al. Using second harmonic generation to predict patient outcome in solid tumors. **BMC Cancer.** v. 151, p.1–10. 2015.

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. 1–19. 2017.

CARVALHO, M. I. et al. A comparative approach of tumor-associated inflammation in mammary cancer between humans and dogs. **BioMed. Res. Int.** 12p. 2016c.

CAVALCANTI, MF & CASSALI, GD. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Revista Clínica Veterinária.** v. 61. P 56-63. 2006.

CASSALI, GD. Estudo morfológico, imunohistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 80p. 2000.

CASSALI, GD. Patologias da Glândula Mamária. In: Nascimento EF & Santos RL (Eds.) **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. P.119-133. 2002.

CASSALI, GD et al. Canine mammary mixed tumours: A review. **Vet Med Int.** v.2012, 7p. 2012.

CASSALI, GD et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian J Vet Pathol.** v. 7, n. 2, p. 38–69. 2014.

CONKLIN, MW et al. Collagen alignment as a predictor of recurrence after ductal carcinoma in situ. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 27, n. 2, p. 138–45. 2018.

DALECK, C. R. et al. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino: clinical and surgical evolution. **Ciência Rural.** v. 28, n. 1, P 95-100. 1998.

DAMASCENO, KA 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. **Histology and Histopathology.** 35p. 2016.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência De Neoplasias E Modalidades De Tratamentos Em Cães, Atendidos No Hospital Veterinário Da Universidade Federal Do Paraná. **Archives of Veterinary Science.** v. 7, n. 2, p. 15–26. 2002.

DESA, D. E. et al. Second-harmonic generation directionality is associated with neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer core needle biopsies. **J Biom Opt.** v. 24, n. 8, 10p. 2019.

DUCHEZ, B. J. et al. Durotaxis by Human Cancer Cells. **Biophysical Journal,** v. 116, n. 4, p. 670–683, 2019.

EBATA, H. et al. “General cellular durotaxis induced with cell-scale heterogeneity of matrix-elasticity”. **Biomaterials,** p. 119647, 2019.

ERDELYI, I et al. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. **Histochem. Cell Biol**, v.124, p. 139-149. 2005.

ESTRELA-LIMA, A. et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**. 2010, V 10. 1-14p.

FALZON, G et al. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer. **Phys Med Biol**. 2008, V 53, N 23, P 6641–52.

FOLGUERAS, A.R. et al. Matrix metalloproteinases in cancer: From new functions to improved inhibition. **Int J Dev Biol**. v. 48, n. 5, p. 411–24. 2004.

FRIEDL, P. & BRÖCKER, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 1, p. 41–64, 2000.

GAMBA, C. O. et al. ZEB2 and ZEB1 expression in a spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 3, p. 554–559, 2014.

GAMBA, C. O. et al. The Relationship Between E-Cadherin and its Transcriptional Repressors in Spontaneously Arising Canine Invasive Micropapillary Mammary Carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, n. 4, p. 256–265, 2015.

GARCIA, A. M. et al. Second harmonic generation imaging of the collagen architecture in prostate cancer tissue. *Biomedical Physics & Engineering Express*, v. 4. 2017.

GENELHU, M. C. et al. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer**, v. 7, p. 218, 2007.

GILBERTSON, S. R. et al. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Vet. Pathol**. v. 20, p. 127–142. 1983.

GOLARAEI, A et al. Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy. **Biomed Opt Express**. v. 10, p. 4054. 2016.

GOSWAMI, S. et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1 / epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Research**. v.65, n. 12, p. 5278–5284. 2005.

GRANDI, F. et al. Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. **BMC Vet Res**, v. 6, p. 45, 2010.

GUO, S & DENG, C. Effect of Stromal Cells in Tumor Microenvironment on Metastasis Initiation. **International Journal of Biological Sciences**. 14p. 2018.

HANAHAN, D. & COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**. v. 21, p. 309–322. 2012.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**. v 05. 31p. 2019.

HALL, MS et al. Fibrous nonlinear elasticity enables positive Mechanical feedback between cells and ECMs. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 113, n. 49, p. 14043–8. 2016

HELLMEN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **J Dairy Res**, v. 72 Spec No, p. 90-7, 2005.

HILL, BS et al. Seminars in Cancer Biology Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer. **Semin Cancer Biol**. 12p. 2019.

HOMPLAND, T. et al. A. Second-harmonic generation in collagen as a potential cancer diagnostic parameter. **Journal of Biomedical Optics**. v. 13, p. 1–11. 2008.

IMIOLEK, M. Studies of nonlinear absorption of eosins using two photon induced fluorescence. n. August, p. 39, 2014.

KARLSSON, E. K. & LINDBLAD-TOH, K. (2008). Leader of the pack: gene mapping in dogs and other model organisms. **Nat. Rev. Genet**. v. 9, p. 713–725. 2008.

KURODA, H. et al. Clinical and pathologic features of invasive micropapillary carcinoma. **Breast Cancer**, v. 11, n. 2, p. 169-174, 2004.

KURZMAN, I. D. & GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 1, n. 1, p. 25–32, 1986.

LEWIS, J. E.; OLSEN, K. D.; SEBO, T. J. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. **Hum Pathol**, v. 32, n. 6, p. 596-604, Jun 2001.

LIU, D. et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer Res**. v. 74, p. 5045–5056. 2014

LONGFORD ,FGJ. PyFibre - Python Fibrous Image Analysis Toolkit. p 1-25. 2019.

MARINHO, V.F.Z., SANCHES, F.S.F., REZENDE, M.A., ANDRADE, V.P., GOBBI, H., 2007. Carcinoma micropapilar invasor da mama: aspectos anatomopatológicos, imunohistoquímicos e evolutivos de um tipo histológico subdiagnosticado. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 43, 57.

MARKKANEN, E. Know Thy Model: Charting Molecular Homology in Stromal Reprogramming Between Canine and Human Mammary Tumors. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 1, n. 7, 12p. 2019.

MARTINS, LM et al. Expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer and breast fibroadenoma: a randomized, double-blind study. **Oncotarget**. v. 10, n. 64, p. 6879-6884. 2019.

MIDDLETON, L.P., TRESSERA, F., SOBEL, M.E., BRYANT, B.R., ALBURQUERQUE, A., GRASES, P., MERINO, M.J., 1999. Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. **Modern Pathology** 12, 499-504.

MIERKE, ET. The Matrix Environmental and Cell Mechanical Properties Regulate Cell Migration and Contribute to the Invasive Phenotype of Cancer Cells. **Review article in Reports on Progress in Physics**. 141p. 2019.

MISDORP, W et al. Canine malignant mammary tumors III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Vet. Pathol.** v. 10, p. 241–256. 1973.

MISDORP, W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. v. 7, n. 2, p. 63-64. 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten D.J. (Ed.), **Tumors in Domestic Animals**. 4ed. P. 575-606. 2002.

MORIYAMA, K. & KIDOAKI, S. Cellular Durotaxis Revisited: Initial-Position-Dependent Determination of the Threshold Stiffness Gradient to Induce Durotaxis. **Langmuir**, v. 35, n. 23, p. 7478–7486, 2019.

NASSAR, H., PANSARE, V., ZHANG, H., CHE, M., SAKR, W., ALI-FEHMI, R.,GRignon, D.,SARKAR, F.,CHENG, J.,ADSAY, V., 2004 Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. **Modern Pathology** 17, 1045–1050.

NASSAR, H. et al. Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein. *Mod. Pathol.*, v. 17, p. 1045–1050, 2004a. NASSAR, H. Carcinomas with Micropapillary Morphology Clinical Significance and Current Concepts. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 11, n. 6, p. 297-303, 2004b.

NATAL, R. A. et al. Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer. **Tumor Biol**. v. 40, n. 4, p. 1–12. 2018.

NATAL, R. A. et al. Exploring Collagen Parameters in Pure Special Types of Invasive Breast Cancer. **Sci Rep**. v. 9, n. 1, p. 1–11. 2019.

- NUNES, FC et al. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.6, p.1714-1722, 2018.
- NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Res. Treat.** v.167, p. 635-648. 2017.
- OWEN, LN. Classification of Tumours I M Domestic Animals Ed I Ted. **World Health Organization.** 53p. 1980.
- PETTINATO, G. et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinicopathologic study of 62 cases of a poorly recognized variant with highly aggressive behavior. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 121, p. 857-866, 2004.
- PROVENZANO, PP et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Med.** v. 6, p. 1–15. 2008.
- QUEIROGA, F & LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores prognósticos. **RPCV.** v. 97, p. 119-127. 2002.
- QUEIROGA, F. L. et al. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **In vivo.** v. 25, p. 455-465. 2011b.
- RAZZAK, M & MARSHAL, L. Breast Cancer. **Nature Reviews Disease Primers.** 10.1038/s41572-019-0111-2. 1p. 2019.
- RIVERA, P & EULER, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Vet Pathol.** v. 48, p. 132–46. 2011.
- REZAKHANIHA, R et al. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. **Biomech Model Mechanobiol.** v. 11, n. 4, p. 461-73. 2012.
- RUMI, M. & PERRY, J. W. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. **Advances in Optics and Photonics**, v. 2, n. 4, p. 451, 2010.
- SANTOS, A. et al. Advances in the understanding of the clinically relevant genetic pathways and molecular aspects of canine mammary tumours. Part 2: invasion, angiogenesis, metastasis and therapy. **Vet. J.** v. 205, p. 144–153. 2015.
- SCHWARTZ, T. L. et al. Metaplastic breast cancer: histologic characteristics, prognostic factors and systemic treatment strategies. **Exp Hematol Oncol**, v. 2, n. 1, p. 31, 2013.

SIMPSON, P. T. et al. Molecular evolution of breast cancer. **J. Pathol.** v. 205, p. 248–254. 2005.

SIRIAUNGGUL, S.; TAVASSOLI, F. A. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. **Mod. Pathol.**, v. 6, n. 6, p. 660-662, 1993.

SORENMO, K.U. Canine mammary gland tumors. **Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.** v. 33, p 573-596. 2003.

SORENMO, K.U. et al. Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Vet. Comp. Oncol.** v. 7, n. 3, p. 162-172. 2009.

TAN, WJ et al. Second harmonic generation microscopy is a novel technique for differential diagnosis of breast fibroepithelial lesions. **J Clin Pathol.** v. 68, n. 12, p. 1033-5. 2015.

TAVASSOLI, F.A., DEVILLEE, P., 2003. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, **World Health Organization**, Lyon, pp. 35-36.

TILBURY, K & CAMPAGNOLA, PJ. Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. **Perspect Medicin Chem.** v. 7, p. 21–32. 2015.

TSE, G. M. et al. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological review. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 10, p. 1079-83, Oct 2006.

TORÍBIO, JM et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de salvador **Bahia. Rev Ceres.**, v. 59, n. 4, p. 427–33. 2012.

Tipos de câncer: câncer de mama | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [Acesso em 15 Jan 2020]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.

TUER, AE et al. Nonlinear optical properties of type i collagen fibers studied by polarization dependent second harmonic generation microscopy. **J Phys Chem B.** v. 115, n. 44, p. 12759–69. 2011.

UENO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. **Clin. Cancer Res.** v. 6, p. 3282–3289. 2000.

UNGEFROREN, H et al. Interaction of tumor cells with the microenvironment. **Cell Commun Signal.** V. 9, 18p. 2011.

UVA, P et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics.** v. 10, p.1–20. 2009.

VOZ, M. L.; VAN DE VEN, W. J.; KAS, K. First insights into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Adv Dent Res**, v. 14, p. 81-3, Dec 2000.

WALSH, M.M., BLEIWEISS, I.R.A.J., 2001. Invasive Micropapillary Carcinoma of the Breast: Eighty Cases of an Underrecognized Entity. **Human Pathology** 32, 583-589.

WANG, H & QIAN, X. Giant optical second harmonic generation in two-dimensional multiferroics. **Nano Lett.** v. 17, n. 8, p. 5027–34. 2017.

WEIGELT, B. et al. Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 3, p. 147-8, Mar 2014.

WYCKOFF, J. B. et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. **Cancer Res.** v. 64, p. 7022– 9. 2004.

ZEKIOGLU, O., ERHAN, Y., IRIS, M.C., BAYRAMOGLU, H., ZDEMIR, N.O., 2004 Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. **Histopathology** 44, 18–23.

ZHANG, K. et al. The collagen receptor discoidin domain receptor 2 stabilizes SNAIL1 to facilitate breast cancer metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 677–687, 2013.

9. ANEXOS

Anexo 01: Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários em cadelas, segundo Owen 11980.

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a : não fixo b : fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a : não fixo b : fixo
T3 Tumor > 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao músculo	Metástases à Distância (M)
T4 Tumor de qualquer tamanho (Carcinoma inflamatório)	M0 Sem evidência de metástase distante M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais

Agrupamento por estádios

Estadiamento da OMS modificado para tumores mamários da cadela

Estadiamento	T	N	M
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
Estádio IV	T1; T2; T3	N1	M0
Estádio V	T1; T2; T3	N0 ; N1	M1

T- Tamanho do tumor primário; N - Linfonodo; M - Metástase

Fonte: Owen, 1980 modificado por Cavalcanti e Cassali, 2006.

Anexo 02: Critérios utilizados na graduação de tumores mamários caninos conforme o grau de malignidade.

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante à célula normal (2 a 3 x o tamanho da hemácia)	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Alocação do grau tumoral

<u>Total de escore</u>	<u>Grau de malignidade</u>
3 – 5	I
6 – 7	II
8 – 9	III

Fonte: Owen, 1980 modificado por Cavalcanti e Cassali, 2006.

Anexo 03: Certificado CEUA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO", protocolo do CEUA: 251/2018 sob a responsabilidade de Geovanni Dantas Cassali que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/10/2018.

Vigência da Autorização	08/10/2018 a 07/10/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Lâmina de mama normal / INDEFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de hiperplasia ductal / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de adenoma / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de papiloma / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de carcinoma in situ / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de carcinoma tubular / INDIFERENTE
Nº de animais	23

Peso/Idade	8kg / 10(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de carcinoma sólido / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de carcinoma lobular / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG
*Espécie/linhagem	Lâmina de carcinoma em tumor misto / INDIFERENTE
Nº de animais	23
Peso/Idade	8kg / 8(anos)
Sexo	feminino
Origem	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFMG

Considerações posteriores:

08/10/2018	Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 08/10/2018. Validade: 08/10/2018 à 07/10/2023 RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.
------------	--

Belo Horizonte, 08/11/2018.

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

10. APÊNDICES

PARTICIPAÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO DE MARÇO DE 2018 A FEVEREIRO DE 2020

RELACIONADAS À DISSERTAÇÃO

a) Resumos publicados em anais de eventos

GARCIA, A.P.V.; NUNES, M.M.; REIS, L.A.; PAULA, A.M.; CASSALI, G.D. **Avaliação do colágeno em neoplasias mamárias por Geração de Segundo Harmônico**. In: VI Encontro de Patologia da UFMG, Belo Horizonte/MG, 2018.

GARCIA, A.P.V.; NUNES, L.A.; PAULA, A.M.; CASSALI, G.D. **Geração de segundo harmônico na avaliação do colágeno em neoplasias mamárias**. In: III Colóquio Técnico-científico da Medicina Veterinária da UniBH, Belo Horizonte, 2019.

GARCIA, A.P.V.; NUNES, L.A.; PAULA, A.M.; CASSALI, G.D. **Alteração das fibras colágenas em neoplasias mamárias medidas por Geração de Segundo Harmônico**. X ONCOVET. Belo Horizonte, 2019.

NÃO RELACIONADAS À DISSERTAÇÃO

a) Participação em Mesas Redondas

Título: Vida Profissional com ex-alunos do curso de Biomedicina.

Nome e local do evento: VI Semana da Biomedicina (PUC Minas).

Data: 07/11/2018

b) Palestras ministradas

Título: Áreas de habilitação do biomédico.

Nome e local do evento: Simpósio de Biomedicina (Centro Universitário Una - Linha Verde).

Data: 20/11/2018.

APERFEIÇOAMENTO NO PERÍODO DE MARÇO DE 2018 A FEVEREIRO DE 2020

ESPECIALIZAÇÃO

Pós-graduação *lato sensu*: Docência no Ensino Superior.

Nome da instituição: Universidade Cândido Mendes.

Número de horas: 529 horas (concluído).

MINISTRAÇÃO DE AULAS

Curso: Introdução ao Estudo da Patologia (Educação a Distância).

Local: Núcleo de Aprimoramento Científico (NACientífico).

Carga horária: 60 horas.