

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG
Faculdade de Medicina
Instituto de ciências biológicas

Daiana Yively Osorio Taborda

**AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS
DE CADELAS PELA MICROSCOPIA POR GERAÇÃO DE SEGUNDO
HARMÔNICO (SHG)**

Belo Horizonte

2022

Daiana Yively Osorio Taborda

**AVALIAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM TUMORES MISTOS MAMÁRIOS
DE CADELAS PELA MICROSCOPIA POR GERAÇÃO DE SEGUNDO
HARMÔNICO (SHG)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia 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

Coorientadoras:
Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Paula
Prof.^a Dr.^a Tamara Cristina Moreira

Belo Horizonte
2022

043

Taborda, Daiana Yively Osorio.

Avaliação das fibras colágenas em tumores mistos mamários de cadelas pela microscopia por Geração de Segundo Harmônico (SHG) [manuscrito] / Daiana Yively Osorio Taborda. – 2022.

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

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali. Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Paula; Prof.^a Dr.^a Tamara Cristina Moreira.

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

1. Patologia. 2. Neoplasias Mamárias Animais. 3. Cães. 4. Microscopia de Geração do Segundo Harmônico. 5. Metástase Linfática. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Paula, Ana Maria de. III. Moreira, Tamara Cristina. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



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

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 451 DE DAIANA YIVELY OSORIO TABORDA

Realizou-se, no dia 25 de julho de 2022, às 14 horas, no formato *híbrido*, CAD-1, sala 407/UFMG, a defesa de Dissertação, intitulada **“Avaliação das Fibras Colágenas em Tumores Mistos Mamários de Cadelas pela Microscopia por Geração de Segundo Harmônico (SHG)”**, apresentada por **Daiana Yively Osorio Taborda**, número de registro 2020715281, graduada no curso de Medicina Veterinária Y Zootecnia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Prof^ª. Angelica Cavalheiro Bertagnolli – IPVDF/RS; Prof^ª. Denise Maria Zzell – USP/SP; Prof^ª. Tamara Moreira Lopes – UNIPAC/MG - COORIENTADORA; Prof^ª. Ana Maria de Paula – ICEX/UFMG – COORIENTADORA; e Prof. Geovanni Dantas Cassali – ICB/UFMG – ORIENTADOR.**

A Comissão considerou a Dissertação:

APROVADA

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

Belo Horizonte, 25 de julho de 2022.

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



Documento assinado eletronicamente por **Geovanni Dantas Cassali, Professor do Magistério Superior**, em 16/08/2022, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tamara Cristina Moreira Lopes, Usuário Externo**, em 26/08/2022, às 10:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Maria Zzell, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 18:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica Cavalheiro Bertagnolli Rodrigues, Usuária Externa**, em 13/09/2022, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

14/09/2022 13:30

SEI/UFMG - 1679156 - Ata



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

, informando o código verificador **1679156** e o código CRC **4202A6DE**.

Referência: Processo nº 23072.243619/2022-82

SEI nº 1679156

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Marilennys e Oscar.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marilennys e Oscar, e a minha madrastra Yina, por me apoiarem em todos os meus sonhos desde a infância, mesmo que alguns deles parecessem impossíveis e representassem uma enorme distância entre nós. Esse incentivo me trouxe ao Brasil e somente vocês permitiram tornar isto possível... Vocês me permitiram voar!

Aos meus irmãos, Jennifer, Jhon, Estiven, Kiara e Juan, aos mais velhos por estarem presente me motivando para nunca desistir deste sonho e aos meus irmãos mais novos por trazer luz a minha vida.

À minha nova família do Brasil, em especial a Vanilda, que até o dia de hoje me acolhe como uma de suas filhas me fazendo a cada visita ter a sensação e o conforto de estar em casa.

Ao Dânthanny por me apoiar estando presente todos os dias que precisei de acolhimento e também por me auxiliar em todo esse processo, escutando as minhas apresentações e lendo meus trabalhos (e tudo isso só mil vezes).

Ao professor Geovanni, por me orientar e ensinar sobre o que é fazer pesquisa, sempre se colocando à disposição para auxiliar no meu processo de formação. Sou grata pelas pessoas que conheci através de você que se tornaram minha família e amigos no Brasil. Obrigada tudo!

À Ana Paula e Luana, por me ensinar tudo sobre uma técnica que nunca imaginei trabalhar. Não consigo imaginar como seria esse processo sem a amizade brindada. Não esperava diferente vindo de vocês, grandes mulheres pesquisadoras!

Às minhas coorientadoras Ana Maria e Tamara pelo suporte e apoio, mesmo de maneira virtual. Obrigada por confiarem em mim e no meu trabalho. Tenho muito carinho e admiração por vocês.

À todas as mulheres do laboratório: Thaynan, Evelyn, Fernanda Freitas, Fernanda Rezende, Juliana, Paula, Isabella, Júlia, Nayara, Amanda, Daiany, Mayra e Camila. Todas vocês foram um importante apoio neste processo. Adorei dividir nossos momentos de alegria, que vão dos laborais até os diversos cafés que tomamos juntas.

Aos professores, Dr.^a Denise Maria Zezell, Dr.^a Angélica Bertagnolli e Dr. Enio Ferreira, pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa da dissertação.

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.

**“Por ser mulher, devo fazer esforços incomuns para ter sucesso. Se eu falhar, ninguém
dirá: Ela não tem o que é preciso. Eles dirão: As mulheres não têm o que é preciso.”
- Clare Boothe Luce**

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.

RESUMO

O estudo dos tumores mamários é de grande importância na medicina veterinária por se tratar do tipo de neoplasia mais comum que acomete cadelas. Dentro dos tumores que se apresentam na glândula mamária, os tumores mistos representam aproximadamente 50% dos casos na rotina diagnóstica, sendo que, o tumor misto benigno (TMB) e o carcinoma em tumor misto (CTM) compõem este grupo de neoplasias. Animais diagnosticados com CTM apresentam um bom prognóstico e um maior tempo de sobrevivência em comparação a outros carcinomas mamários. Embora os CTM apresentem um bom comportamento e raramente desenvolvem metástase, existem alguns casos que evoluem a metástase ganglionar, mudando assim, o comportamento e conseqüentemente, o prognóstico. Por isso, a identificação de alterações no microambiente tumoral (TME) pode ser responsável pela maior agressividade das células cancerosas do CTM. O microambiente é integrado por todos os elementos que interagem com as células cancerosas, incluindo a matriz extracelular (MEC) e esta é composta principalmente por fibras colágenas. Na progressão tumoral, as fibras colágenas são o principal alvo das células cancerosas e as suas alterações facilitam o surgimento de metástases. Assim, o objetivo deste estudo foi correlacionar as alterações das fibras colágenas de CTM que possam estar associadas à presença de metástase ganglionar. Foram avaliados 46 casos de tumores mistos da glândula mamária canina; 15 casos de tumor misto benigno, 16 casos de carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar e 15 de carcinoma em tumor misto com metástase ganglionar. A avaliação foi realizada utilizando a microscopia por excitação de dois fótons, na qual foram obtidas imagens nas áreas de interesse e extraídos os dados do colágeno e do componente celular. A análise das imagens e a comparação entre os diferentes grupos tumorais e lâminas controles de tecido mamário canino normal corados em H&E, permitiram avaliar as fibras colágenas nas diferentes fases da progressão tumoral. Demonstramos que os parâmetros do colágeno se correlacionam com os dados clínicos e patológicos como a expressão de marcadores imunohistoquímicos como ciclo-oxigenase-2 (COX2). Os resultados demonstraram que os casos carcinomatosos que evoluíram com metástase ganglionar apresentam menor comprimento das fibras colágenas. Também foi possível observar que antes do aparecimento da metástase ganglionar as fibras começam a se alinhar, facilitando assim a saída das células cancerosas e conseqüentemente a progressão da doença. Na avaliação do componente celular neoplásico dos casos carcinomatosos. Finalmente, observamos que o número de fibras colágenas se correlaciona com a COX2.

Palavras-chaves: Neoplasia mamária animal, cães, microscopia por geração do segundo harmônico, metástase linfática (MeSH).

ABSTRACT

The study of mammary tumors is essential in veterinary medicine because they are the most common neoplasms in female dogs. Within the tumors in the mammary gland, mixed tumors represent approximately 50% of the cases in the diagnostic routine, and the benign mixed tumor (BMT) and mixed tumor carcinoma (CMT) make up this group of neoplasms. Animals diagnosed with MSC have a good prognosis and a longer survival time compared to other mammary carcinomas. Although MSCs have good behavior and rarely develop metastasis, some cases progress to lymph node metastasis, thus changing the behavior and, consequently, the prognosis. Therefore, identifying changes in the tumor microenvironment (TME) may be responsible for the greater aggressiveness of CMT cancer cells. The microenvironment is integrated by all the elements that interact with cancer cells, including the extracellular matrix (ECM) and this is mainly composed of collagen fibers. In tumor progression, collagen fibers are the main target of cancer cells and their alterations facilitate the emergence of metastases. Thus, this study aimed to correlate changes in CMT collagen fibers that may be associated with the presence of lymph node metastasis. 46 cases of mixed tumors of the canine mammary gland were evaluated; 15 cases of benign mixed tumors, 16 cases of carcinoma in a mixed tumor without lymph node metastasis, and 15 cases of carcinoma in a mixed tumor with lymph node metastasis. The evaluation was performed using two-photon excitation microscopy, in which images were obtained in the areas of interest and data on collagen and cellular component were extracted. The analysis of the images and the comparison between the different tumor groups and control slides of normal canine mammary tissue stained in H&E allowed the evaluation of collagen fibers in the different stages of tumor progression. We demonstrated that collagen parameters correlate with clinical and pathological data such as the expression of immunohistochemical marker cyclooxygenase-2 (COX2). The results showed that the carcinomatous cases that evolved with lymph node metastasis have a shorter length of collagen fibers. It was also possible to observe that before the appearance of lymph node metastasis the fibers begin to align, thus facilitating the exit of cancer cells and consequently the progression of the disease. Finally, we observed that the number of collagen fibers correlated with COX2.

Keywords: Animal mammary neoplasm, dogs, second harmonic generation microscopy, lymphatic metastasis (MeSH).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Diagrama representativo das características moleculares do colágeno tipo 1 e sua organização em ordem crescente..... 21
- Figura 2** – Esquema representativo da microscopia por geração de segundo harmônico..... 22
- Figura 3** - Anticorpos recomendados no *Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019*..... 24

LISTA DE ABREVIATURAS

COX2: Ciclooxigenase-2

CSS: Carcinossarcoma

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

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

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

ICEx: Instituto de Ciências Exatas

LOX: Lisil oxidase

MB: Membrana Basal

MEC: Matriz extracelular

MI: Matriz intersticial

MMPs: Metaloproteinases

RE: Receptor de estrógeno/Estrogen receptor

RP: Receptor de progesterona/Progesterone receptor

SHG: Second Harmonic Generation/Geração do segundo harmônico

TMB/BMT: Tumor misto benigno/Benign mixed tumor

TME: Microambiente tumoral

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 O câncer de mama.....	17
2.2 Tumores mistos da glândula mamária canina.....	17
2.3 Morfologia dos tumores mistos.....	18
2.3.1 <i>Tumor misto benigno</i>	18
2.3.2 <i>Carcinoma em tumor misto</i>	18
2.3.3 <i>O microambiente tumoral</i>	19
2.4 Fibras colágenas.....	19
2.5 Microscopia por excitação de dois fótons.....	20
2.5.1 <i>Geração do segundo harmônico</i>	20
2.6 Alterações do colágeno relacionado ao câncer.....	21
2.6.1 <i>Colágeno no câncer de mama</i>	22
2.7 Marcadores moleculares no câncer mama.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
6. ANEXOS.....	57
7. APÊNDICES.....	59

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama em mulheres é o tipo de neoplasia maligna mais diagnosticada no mundo segundo dados publicados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), da mesma forma, em cadelas, os tumores mamários são o tipo de neoplasia diagnosticada com maior frequência (SCHNEIDER, 1970; KHANNA, 2007; IARC, 2020; PAOLONI). O câncer de mama na medicina veterinária se mantém em aumento, uma vez que, os animais domésticos são expostos aos fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença (PAOLONI; KHANNA, 2007). As neoplasias mamárias de ambas as espécies apresentam similaridades histológicas, genéticas, moleculares e respostas a tratamentos, tornando assim, as cadelas um bom modelo comparativo (ABADIE *et al.*, 2018; CASSALI *et al.*, 2002; GRAY *et al.*, 2020).

Na rotina diagnóstica, o tumor misto benigno (TMB) e o carcinoma em tumor misto (CTM) representam entre 40 a 50% de todos os tumores que acometem a glândula mamária em cadelas (NUNES, *et al.*, 2018; STRANDBERG; GOODMAN, 1974). O CTM é considerado uma neoplasia de bom prognóstico, uma vez que animais acometidos com este tumor apresentam um maior tempo de sobrevivência e não tendem a desenvolver metástase ganglionar e a distância (CASSALI *et al.*, 2017; NUNES, *et al.*, 2018). Entretanto, novos estudos para melhorar a compreensão do comportamento dos CTM e a identificação de mudanças associadas à metástase ganglionar são necessários. Alterações como o aumento da densidade do estroma associado ao tumor têm sido descritas com frequência no câncer de mama da mulher, de modo que, o microambiente se associa estreitamente com as células cancerosas para favorecer a progressão e metastização (BRABRAND *et al.*, 2015; INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016).

O microambiente tumoral (TME) é predominantemente composto por células do sistema imune, fibroblastos, células endoteliais, adipócitos e matriz extracelular (MEC), de forma que, alterações na MEC se relacionam com a progressão dos carcinomas mamários da mulher (BRABRAND *et al.*, 2015; INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016a). Dentre as modificações que ocorrem na MEC, as alterações do colágeno podem se relacionar com a maior agressividade tumoral e à saída das células para os tecidos circunjacentes, para os vasos sanguíneos e linfáticos. Para observar essas mudanças a técnica de microscopia por geração de segundo harmônico (SHG) é considerada uma ferramenta útil e sensível às fibras colágenas em tecidos biológicos como o parênquima mamário (AJETI *et al.*, 2011; BURKE; TANG; BROWN, 2012; NATAL *et al.*, 2018). Estudos apontam que o aumento da densidade mamária no câncer é o resultado do aumento da deposição e organização das fibras colágenas (FRANTZ;

STEWART; WEAVER, 2010; HOMPLAND *et al.*, 2008). Assim, avaliar e correlacionar as alterações das fibras colágenas de CTM que possam estar associadas à presença de metástase ganglionar e as suas características clínico patológicas é de extrema importância para elucidar os mecanismos envolvidos na progressão e conseqüentemente aprimorar os tratamentos destinados à esta neoplasia.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O câncer de mama

O câncer de mama em mulheres foi o tipo de neoplasia maligna mais diagnosticada no mundo no ano 2020, com uma estimativa de 2,26 milhões de novos casos e aproximadamente 685.000 mortes no mundo nesse mesmo ano, segundo dados publicados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Os tumores malignos, que são desenvolvidos na glândula mamária, frequentemente comprometem os linfonodos e se disseminam para outros locais, podendo também apresentar metástases ocultas, aumentando assim, o risco de morte das pacientes acometidas (COTE *et al.*, 1999; NOTTEGAR *et al.*, 2016).

O risco de desenvolver câncer de mama para as cadelas é três vezes maior em comparação às mulheres (KIMURA; GÁRATE; DAGLI, 2012; SCHNEIDER, 1970). O diagnóstico de câncer de mama na medicina veterinária vem aumentando expressivamente e acredita-se que esse aumento de casos esteja relacionado com o crescimento da população dos animais domésticos e à exposição aos fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença (PAOLONI; KHANNA, 2007), sendo que, as neoplasias da glândula mamária em cadelas representam o diagnóstico mais frequente na rotina (SCHNEIDER, 1970). No Brasil, os tumores da glândula mamária representam a maioria dos diagnósticos na espécie canina e dentro dos tumores diagnosticados, os tumores mistos se apresentam com maior frequência (DO CARMO SILVA *et al.*, 2019; STRANDBERG; GOODMAN, 1974).

2.2 Tumores mistos da glândula mamária canina

Um estudo epidemiológico realizado no estado do Espírito Santo, Brasil, encontrou que dentro dos diagnósticos de tumores da glândula mamária canina, o tipo histológico misto ocupa a primeira posição (DO CARMO SILVA *et al.*, 2019). Um levantamento feito pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Patologia Comparada da Universidade Federal de Minas Gerais, mostrou que de 1.539 lesões de mama de cadela avaliadas 45,18% foram de tumores mistos (NUNES, F C *et al.*, 2018). Esta frequência de apresentação também é similar a estudos

realizados em outros países, onde aproximadamente 50% dos casos de neoplasias mamária diagnosticadas são os tumores mistos (STRANDBERG; GOODMAN, 1974).

Dentro do grupo de tumores mistos encontramos o tumor misto benigno (TMB), o carcinoma em tumor misto (CTM) e o carcinosarcoma (CSS), sendo diagnosticados com maior frequência o CTM e TMB (CASSALI *et al.*, 2019). Em relação ao prognóstico, animais que desenvolvem CTM podem alcançar uma sobrevida de 1.800 dias após o diagnóstico, sendo assim, atribuído como um bom prognóstico em comparação com outros tipos histológicos mais agressivos (NUNES, F C *et al.*, 2018). O CTM não apresenta na maioria dos casos metástase ganglionar, mas existem alguns animais que evoluem e se associam com um menor tempo de sobrevida (GONÇALVES *et al.*, 2021; NUNES *et al.*, 2018). O estabelecimento do prognóstico de pacientes acometidos com CTM ainda é um desafio, devido ao fato de que ferramentas como a graduação histológica não podem ser aplicadas pelas escassas áreas de invasão associadas a este tipo histológico (CASSALI *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2019). Sendo assim, o estudo para melhorar a compreensão do comportamento dos CTM e a identificação de mudanças associadas à metástase ganglionar são necessários na medicina veterinária.

2.3 Morfologia dos tumores mistos

2.3.1 Tumor misto benigno

O TMB apresenta proliferação epitelial formando estruturas acinais e ductais acompanhada da presença de uma camada de células mioepiteliais na membrana basal. Também podem ser encontradas células mioepiteliais fusiformes ou estreladas em meio a abundante deposição de matriz extracelular ou matriz mixóide. Além disso, este tumor apresenta proliferação do componente mesenquimal formando tecido cartilaginoso em nódulos ou placas contendo condrócitos e condroblastos, tecido ósseo em forma de matriz osteoide com a presença de osteoclastos que por vezes pode apresentar mineralização e tecido adiposo (CASSALI *et al.*, 2012).

2.3.2 Carcinoma em tumor misto

Existem indícios que os TMB podem sofrer transformação maligna nas cadelas dando origem a focos carcinomatosos, assim, a perda da expressão de alguns marcadores moleculares podem ser os responsáveis pela progressão tumoral (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011). Tem sido observado que alguns animais diagnosticados com CTM apresentavam áreas de células malignas proliferando dentro de TMB, achados que apontam a possível transformação maligna

dos tumores mistos (SORENMO *et al.*, 2009). De forma geral, o que difere o CTM do TMB é a presença de elevado pleomorfismo nuclear, mitoses atípicas, maior celularidade e crescimento infiltrativo (CASSALI *et al.*, 2017; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011).

O CTM se caracteriza pela presença de proliferação epitelial em nódulos ou focos com elevado pleomorfismo e mitoses atípicas. Existem duas formas de apresentação de CTM, *in situ* e invasor que para diferenciá-los devem ser observadas a presença de células neoplásicas invadindo o estroma adjacente. Para isso, as áreas de microinvasão podem ser identificadas como agrupamentos de células neoplásicas ao redor dos ductos com um diâmetro de até 1 mm ou como projeções de células neoplásicas para o estroma acompanhada com a perda da continuidade da membrana basal e da camada de células mioepiteliais (CASSALI *et al.*, 2011). A proliferação do componente mesenquimal é similar ao encontrado nos TMB, este componente pode ser representado na forma de tecido cartilaginoso, ósseo e adiposo. Da mesma forma, é comum encontrar células mioepiteliais em proliferação em meio de matriz mixoide (CASSALI *et al.*, 2017).

2.3.3 O microambiente tumoral

O TME é integrado por todos os elementos que interagem com as células cancerosas. Dentro do TME encontramos um componente celular composto por fibroblastos, células endoteliais, neurônios, adipócitos, células do sistema imune e também encontramos um componente não celular constituído por MEC, quimiocinas, citocinas e demais elementos solúveis circulantes (GIUSSANI *et al.*, 2015; XIAO; YU, 2021).

A MEC é um importante componente do microambiente tumoral que consiste em uma rede composta por proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e polissacarídeos, e que se subdivide em membrana basal (MB) e matriz intersticial (MI) e nesta última o colágeno fibrilar é a proteínas mais abundante. A MEC está em constante regulação e as metaloproteinases (MMPs) junto com as lisil oxidases (LOX) desempenham um importante papel regulatório. (RICARD-BLUM, 2011; XU *et al.*, 2019).

2.4 Fibras colágenas

A síntese das fibras colágenas é realizada dentro e fora do citoplasma dos fibroblastos que, após a formação do RNAm, dão início à formação das cadeias alfa nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso. Posteriormente, as cadeias alfas passam por vários processos enzimáticos que culminam na formação do pró-colágeno, este é liberado para o espaço

extracelular por exocitose culminando, assim, na formação das fibras colágenas fora do citoplasma (ROSS; WOJCIECH, 2015).

A sequência clássica de aminoácidos desta proteína é formada por glicina, prolina e hidroxiprolina que também é conhecida como tropocolágeno. O tropocolágeno, por sua vez, apresenta três hélices na sua estrutura básica e a junção delas é dada por ligações de hidrogênio da glicina juntamente com as torções pelos resíduos de prolina e hidroxiprolina, logo, este padrão de organização é o responsável pela força e suporte desta proteína. As moléculas de tropocolágeno se organizam em fibrilas que formam as fibras colágenas (ROSS; WOJCIECH, 2015).

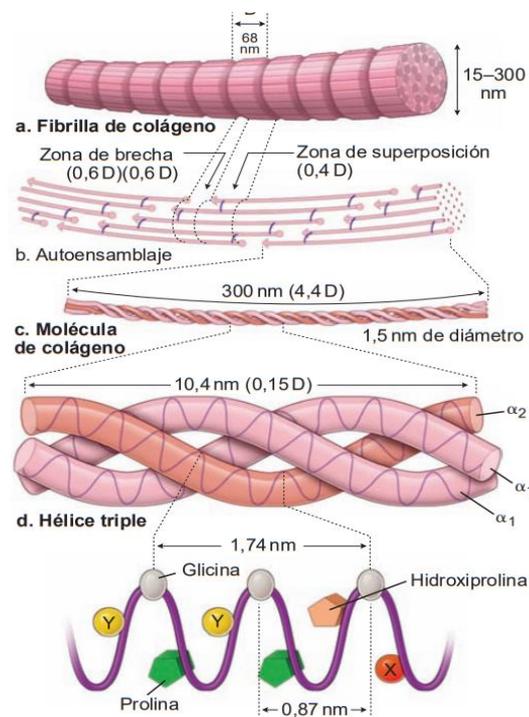


Figura 1: Diagrama representativo das características moleculares do colágeno tipo 1 e sua organização em ordem crescente. Fonte: Ross; Wojciech *et al.*, 2015.

2.5 Microscopia por excitação de dois fótons

2.5.1 Geração do segundo harmônico

Nas décadas de 1980 e 1990, a microscopia multifotônica inovou a observação de tecidos biológicos, sendo que, alguns métodos ópticos não lineares já se tornaram um importante recurso, fornecendo informações exclusivas e, em muitos casos, complementares sobre a amostra biológica (JAMES; CAMPAGNOLA, 2021). Um desses métodos ópticos é a microscopia por SHG que consiste em uma técnica óptica não linear onde dois fótons de um

laser convertem-se em um único fóton com o dobro da frequência e metade do comprimento de onda (CISEK *et al.*, 2021; JAMES; CAMPAGNOLA, 2021; SUN *et al.*, 2004).

A primeira imagem obtida com o uso do SHG na biologia foi feita quando Freund e colaboradores, em 1986, usaram esse mecanismo para obter informações sobre a polaridade das fibras de colágeno no tendão da cauda de um rato, sendo este trabalho o precursor dos estudos atuais. O colágeno é um material ordenado simétrico não central que apresenta propriedades de um microcristal, sendo possível a avaliação mediante esta técnica (JAMES; CAMPAGNOLA, 2021).

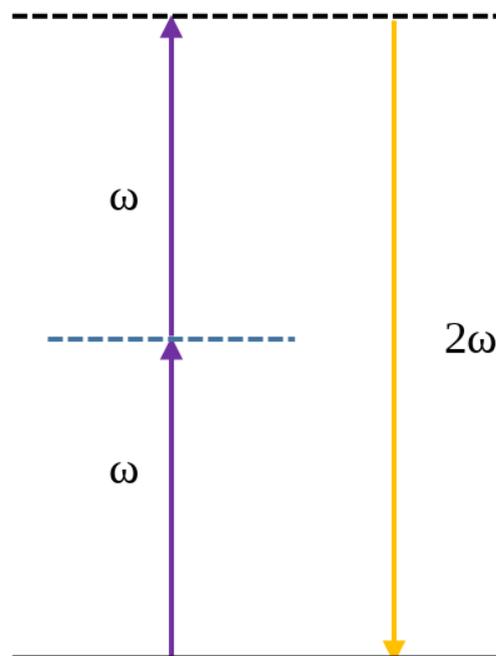


Figura 2: Esquema representativo da microscopia por geração de segundo harmônico. Fonte: Autora da dissertação. Pode ser observada a representação de dois fótons com frequência ω (setas roxas) que interagem e geram um fóton com o dobro da frequência à inicial (seta amarela).

2.6 Alterações do colágeno relacionado ao câncer

Neste trabalho daremos enfoque às alterações das fibras colágenas no câncer. A avaliação dos tumores na rotina se concentra nas características celulares, deixando de lado o estroma associado ao tumor e, principalmente, as fibras colágenas, que em diversos estudos tem se demonstrado um elemento muito importante no contexto de câncer (DRIFKA *et al.*, 2016). O desenvolvimento das células tumorais está intimamente relacionado com as alterações no microambiente que se refletem no “endurecimento” do estroma associado ao tumor (GIUSSANI *et al.*, 2015b; JUNTILA; DE SAUVAGE, 2013).

O colágeno está envolvido em diversos processos complexos, como a interação direta com os receptores da subfamília de tirosina quinase que promovem a migração e adesão celular por meio da ativação da via AKT de células da medula óssea na leucemia mieloide (VENNIN *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2019). Também tem sido descrita a interação do colágeno com um tipo específico de integrinas no carcinoma de células escamosas da boca como um possível responsável pelo aumento da proliferação celular (HAYASHIDO *et al.*, 2014). Ademais, na literatura é encontrado que o colágeno apresenta correlação com alguns fatores prognósticos do câncer de mama como a expressão de receptores hormonais e de fatores de crescimento (TILBURY; CAMPAGNOLA, 2015; ZHANG *et al.*, 2020).

As fibras colágenas apresentam uma relação direta com as células neoplásicas, mutações celulares no gene TP53 se associaram com alterações na arquitetura do colágeno encontradas na periferia do tumor (VENNIN *et al.*, 2017; XU *et al.*, 2019). Em cultura de células de carcinoma colorretal associado a fibroblastos, foi observada a formação de uma rede de colágeno densa e organizada, demonstrando que os fibroblastos são aliados das células neoplásicas e, conseqüentemente, podem ser importantes mediadores das alterações nas fibras colágenas encontradas no estroma tumoral (DRUZHKOVA *et al.*, 2020). Um outro estudo *in vitro* de câncer pancreático associado a fibras colágenas alinhadas relatou maior sensibilidade a fármacos como o Gemcitabina e Paclitaxel, o que demonstra que os tumores não se limitam somente à proliferação celular neoplásica (DAI *et al.*, 2020).

2.6.1 Colágeno no câncer de mama

A maior densidade da glândula mamária observada na mamografia se correlaciona com um maior risco de desenvolver neoplasias mamárias. O *status* reprodutivo é uma condição que influencia a quantidade de fibras colágenas no tecido mamário, já que, no período de involução há uma maior deposição de fibras colágenas, aumentando assim, o risco de desenvolver câncer de mama (GUO *et al.*, 2022).

Foram descritas 3 TACS (*Tumor-Associated Collagen Signatures*) ou assinaturas do colágeno associadas ao câncer das fibras colágenas no câncer invasivo de mama. A primeira assinatura consiste na presença de abundantes fibras colágenas circundando e contendo a proliferação neoplásica na fase inicial. A segunda, consiste na organização de forma paralela ao limite do tumor na fase de progressão. Por último, a organização das fibras perpendicularmente no limite do estroma tumoral, orientadas em direção à área de invasão celular (DRAVID; MAZUMDER, 2018; RUEDEN *et al.*, 2009).

Em relação ao prognóstico, achados associados ao colágeno podem prever a sobrevida de pacientes com câncer (ZHOU *et al.*, 2017). Em tumores da glândula mamária canina foi encontrada uma correlação entre o tamanho das fibras e o tempo de sobrevida das cadelas (GARCIA *et al.*, 2021).

O microambiente tumoral das neoplasias mamárias de cadelas ainda não é bem elucidado, quanto à função e interação dos diferentes componentes, com enfoque para o colágeno e a relação com fatores clínicos. Diante disso, a avaliação do microambiente tumoral em relação às alterações quantitativas, organizacionais e de uniformidade do colágeno pela microscopia de segundo harmônico, associada à caracterização imunofenotípica e clínico-patológica poderão fornecer informações importantes para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das cadelas.

2.7 Marcadores moleculares no câncer mama

A imuno-histoquímica é uma ferramenta que permite a avaliação de marcadores moleculares úteis para a determinação dos fatores prognósticos e preditivos na medicina veterinária (CASSALI *et al.*, 2020). O painel imuno-histoquímico recomendado para as espécies canina e felina é composto pelos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP), Ki67 eCiclo-oxigenase-2 (COX-2).

Target antigen (clone)	Manufacturer	Dilution	Antigen retrieval method	Incubation time (h)/ temperature
Ki-67 (MIB-1)	Dakocytomation	1:25	Pressurized heat (125°C/2 mins) with citrate buffer pH 6.0*	1/room temperature
ER (1D5)	Dakocytomation	1:20	Pressurized heat (125°C/2 mins) with EDTA buffer pH 9.0*	1/room temperature
PR (HPR2)	Neomarkers	1:20	Pressurized heat (125°C/2 mins) with EDTA buffer pH 9.0*	1/room temperature
COX-2 (SP21)	Neomarkers	1:80	Water bath (98°C/20 mins) with citrate buffer pH 6.0*	1/room temperature

Source: De Campos *et al.* (25).

Figura 3: Anticorpos recomendados no *Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors – 2019*. Fonte: CASSALI *et al.*, 2020.

Lesões não neoplásicas e adenomas apresentam maior marcação de RE em comparação a carcinomas, a marcação também varia de acordo com o grau histológico, carcinomas de baixo grau apresentam maior marcação em comparação aos graus intermediários e altos (MORRIS *et al.*, 2008). Em relação à expressão do RP, foram identificados em células neoplásicas proliferativas perfis positivo e negativo para RP. O grupo que apresentava o perfil positivo era caracterizado por apresentar baixo grau histológico e maior tempo de sobrevida livre de doença

e no tratamento hormonal adjuvante apresentava uma boa resposta e uma menor chance de recorrência quando comparado com o grupo de perfil negativo (UENO *et al.*, 2018).

O Ki67 é uma proteína encontrada em células em proliferação, estando presente em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0 (LIN; PRICHARD, 2015). O Ki67 é um importante marcador prognóstico no câncer de mama. A marcação desta proteína maior que 20% das células neoplásicas totais se associa com um comportamento mais agressivo e a um pior prognóstico (CASSALI *et al.*, 2020). Outro marcador relacionado com agressividade e pior prognóstico é a superexpressão de COX2, tal proteína influencia a proliferação celular, inibição da apoptose, indução da angiogênese e modulação do sistema imune (ARAÚJO *et al.*, 2016; DENKERT *et al.*, 2001; DORÉ, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo a avaliação de alguns marcadores permite a implementação de tratamentos com inibidores específicos como os inibidores da COX2 e HER2 (COATES *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar as alterações das fibras colágenas dos tumores mistos e correlacionar-las com características clinico-patológicas, expressão de marcadores imuno-histoquímicos como COX2, Ki67, HER2, RP e RP e presença de metástase ganglionar e o impacto no tempo de sobrevida.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a quantidade, arquitetura e orientação das fibras colágenas em tumores mistos;
- Correlacionar as alterações na quantidade, arquitetura e orientação das fibras colágenas dos tumores mistos com o impacto na sobrevida global das pacientes;
- Correlacionar a expressão dos marcadores KI-67 e COX-2 com os resultados na quantidade, arquitetura e orientação das fibras colágenas dos tumores mistos;
- Correlacionar a expressão dos marcadores KI-67 e COX-2 nos tumores mistos com o impacto na sobrevida global das pacientes.

3. 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 *Veterinary Pathology* e está formatado segundo as normas desta revista.

Alterações das fibras colágenas podem estar relacionadas com metástase linfonodal nos carcinomas em tumores mistos caninos

Daiana Yively Osorio Taborda¹, Ana Paula Vargas Garcia¹, Luana Aparecida Reis², Tamara Cristina Moreira Lopes¹, Ana Maria de Paula², Geovanni Dantas Cassali¹.*

¹Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Resumo:

Os tumores mistos da glândula mamária canina são o tipo histológico neoplásico mais frequente no Brasil. Dentro deste grupo de neoplasias encontramos o tumor misto benigno (TMB) e o carcinoma em tumor misto (CTM). Geralmente, animais diagnosticados com CTM apresentam uma boa resposta ao tratamento e um maior tempo de sobrevida, porém, existem alguns casos que evoluem com metástase ganglionar, o que resulta na piora do prognóstico. A maioria dos estudos do câncer são dirigidos à avaliação das próprias células tumorais, contudo, o desenvolvimento das neoplasias está intimamente relacionado com as alterações na matriz extracelular (MEC). Essas alterações estão presentes principalmente no colágeno, proteína mais abundante da MEC. Diante disso, a técnica de microscopia com excitação por dois fótons (SHG), é um método microscópico altamente sensível que permite avaliar a fibras colágenas com maior precisão em comparação às colorações especiais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características

organizacionais da rede de colágeno nos tumores mistos e identificar mudanças associadas ao surgimento de metástase. Para isso, foram selecionadas 69 amostras distribuídas em 4 grupos: 23 casos de mama normal, 15 casos de tumor misto benigno, 16 casos de carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar e 15 casos de carcinoma em tumor misto com metástase ganglionar. Neste estudo, mediante a implementação de SHG, foi possível observar que a presença de metástase ganglionar nos CTM estava associada a fibras colágenas mais curtas ($p=0,0330$) e mais alinhadas ($p=0,0143$). Também foi possível identificar uma correlação entre a marcação acima de 30% total das células tumorais para COX2 e um menor tamanho de fibras nos CTM ($p= 0,045$). Finalmente, podemos concluir que a análise do CTM por meio de SHG permitiu reconhecer uma característica do colágeno que pode ser responsável pela saída de células neoplásicas para os linfonodos regionais.

Palavras-chaves: Neoplasia mamária animal, cães, microscopia de segunda geração harmônico, metástase linfática (MeSH).

*E-mail: cassalig@icb.ufmg.br

1. Introdução

A prevalência e a incidência das neoplasias mamárias caninas aumentaram nos últimos anos, sendo uma das principais causas de morte nesta espécie. Acredita-se que este aumento esteja relacionado com o crescimento da população de animais e à exposição aos fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença (Paoloni & Khanna, 2007). Os tumores mistos da glândula mamária representam o tipo mais frequentemente diagnosticado na medicina veterinária, alcançando uma proporção de 45,18% dos casos de neoplasia mamárias (11,00% tumores mistos benignos, 44,18% carcinomas em tumores mistos) segundo um levantamento feito no Brasil em 2018 (Nunes *et al.*, 2018).

Habitualmente, animais diagnosticados com CTM podem alcançar sobrevida de 1.800 dias, o que demonstra o bom prognóstico relacionado a este tipo histológico, já que são tumores que não desenvolvem metástases com frequência. Entretanto, trabalhos apontam que a presença de metástases nos CTM está associada a um menor tempo de sobrevida, apresentando uma mediana de 275 dias, o que indica altas taxas de mortalidade (Araújo, de et al., 2015). A discrepância no prognóstico de pacientes acometidos com CTM, representa um problema atual que afeta a conduta dos médicos veterinários e a perspectiva dos pacientes e tutores. A própria complexidade dos CTM é responsável de que ferramentas como a gradação histológica não possam ser aplicadas pelas escassas áreas de invasão na maioria destes tumores (Cassali *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2019).

A implementação do enfoque à matriz extracelular (MEC) que cerca às células tumorais dos CTM pode fornecer informações relevantes que sejam capazes de reconhecer alterações associadas ao risco de surgimento de metástase linfonodal. Alguns autores mencionam que alterações do microambiente que resultam em

“endurecimento” do estroma associado ao tumor, favorecem a progressão tumoral e o processo de metástase (Giussani *et al.*, 2015; Junttila & Sauvage, de, 2013). Acredita-se que essas alterações responsáveis pelo “endurecimento” do estroma acontecem na rede de colágeno que envolve o tumor. O colágeno se caracteriza por ser um material ordenado simétrico não central que apresenta propriedades de um microcristal, o que permite a implementação de métodos ópticos refinados como a microscopia por SHG, técnica óptica não linear onde dois fótons de um laser convertem-se em um único fóton com o dobro da frequência e metade do comprimento de onda (CISEK *et al.*, 2021; JAMES; CAMPAGNOLA, 2021; SUN *et al.*, 2004). Diante disso, a avaliação do microambiente tumoral em relação às alterações quantitativas, organizacionais e de uniformidade do colágeno em neoplasias. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se alterações das fibras colágenas de CTM se relacionam com as características clinico-patológicas, expressão de marcadores imuno-histoquímicos como COX2, Ki67, HER2, RP e RP e presença de metástase ganglionar e o impacto no tempo de sobrevida.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras selecionadas

Foi realizado um estudo retrospectivo de cadelas diagnosticadas com tumores mistos da glândula mamária entre os anos 2011 a 2018. Para este estudo foram selecionados 69 casos em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) distribuídas em 4 grupos: 23 casos de mama normal (MN), 15 casos de tumor misto benigno (TMB), 16 casos de carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar (CTM) e 15 casos de carcinoma em tumor misto com metástase ganglionar (CTMM). As amostras em questão foram adquiridas do Laboratório de Patologia Comparada (LPC) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os casos avaliados no estudo são provenientes de remoções cirúrgicas de lesões neoplásica da glândula mamária realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais e encaminhadas ao laboratório para o diagnóstico histopatológico. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios descritos no *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* de Cassali *et al.* 2020, sistema TNM estabelecido pelo *World Health Organization* (WHO) e sistema de Nottingham modificado por Owen (Cassali *et al.*, 2020; Owen, 1980).

Os casos selecionados cumpriram critérios de inclusão para a realização deste estudo. Foram selecionadas neoplasias que possuíssem linfonodos regionais e laudo de diagnóstico histopatológico completo. Para a realização das correlações, foram coletadas informações clínicas como sexo, idade, status reprodutivo, aplicação de hormônios exógenos, procedimentos cirúrgicos e data do diagnóstico. Também foi realizada a contagem em dias desde a data do diagnóstico até a data de óbito de

todos os animais para a obtenção da sobrevida global dos casos avaliados em este trabalho.

2.2 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 4µm de espessura foram preparados para as reações de imuno-histoquímica, realizadas pelo sistema de detecção por polímero. Foi utilizado um kit comercial de detecção anti-mouse/anti-rabbit (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Para a recuperação dos antígenos dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP), Ki67, Ciclo-oxigenase-2 (COX2) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), utilizou-se o calor a vapor (Pascal®) com citrato pH 6,0 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Dinamarca). As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas com o anticorpo primário apropriado por 16 horas em câmara úmida a 4° C (1:50, clone 1D5, Dako), PR (1:50, clone hPRa2, Neomarkers), HER2 (1:200, policlonal, Dako) e Ki67 (1:50, clone MIB-1, Dako) e COX2 (1:50, clone SP21, Invitrogen). A imunorreatividade foi visualizada com o cromógeno 3'-diaminobenzidina (DAB Substrate System, Dako, Carpinteria, CA, EUA) e contrastada com a hematoxilina de Mayer. Amostras de fragmentos de tecido mamário positivo para RE, RP, HER-2, COX2 e Ki67 foram utilizadas como controles positivos das reações. Para os controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS). A análise das marcações e a classificação dos imunofenótipos foram realizados de acordo com Nunes *et al.* 2019 e Cassali *et al.* 2020. Também foram realizadas correlações entre a expressão dos marcadores com os achados do SHG nas fibras de colágeno

2.3 Microscopia com excitação por dois fótons

A microscopia por geração de segundo harmônico foi realizada no Laboratório de Biofotônica, Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. A montagem consiste em um sistema confocal de varredura laser Olympus FV300 acoplado com um feixe do laser com comprimento de onda de 800nm, que passa através de espelhos de varredura e de um espelho dicróico e com uma objetiva de 20x (N.A. 0,90) incide na lâmina corada em H&E. Foi utilizada uma potência média de 5mW na amostra. Após incidir na amostra, o sinal SHG retro-espalhado é coletado pela objetiva e direcionado pelo espelho dicróico (Semrock FF665-Di02) para o detector (uma fotomultiplicadora, PMT).

Posteriormente, a luz espalhada do laser é removida por um filtro banda fina (20nm de largura de banda) centrado no comprimento de onda do segundo harmônico (400nm) (Garcia *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2020).

A fluorescência por excitação com dois fótons foi realizada utilizando o mesmo equipamento da microscopia por SHG, analisando as mesmas regiões nas que foi coletado o sinal do SHG. Um filtro de banda (560-600nm) é utilizado antes da fotomultiplicadora para eliminar o restante de laser espalhado e selecionar a banda de fotoluminescência a ser coletada por uma segunda fotomultiplicadora, PMT2.

Esta faixa de comprimento de onda é escolhida para medir a fluorescência da eosina. Após incidir na lâmina de H&E, a luz transmitida pela amostra é coletada por uma lente no interior do condensador que é focalizado em uma outra fotomultiplicadora (PMT3) (Garcia *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2020).

Para a avaliação dos casos foram seleccionadas entre 10 a 15 áreas representativas de cada corte histológico, totalizando 966 imagens medidas para os 4 grupos do estudo. Neste estudo foi utilizado como parâmetro de normalidade mama normal (MN). Para a captura das imagens foram evitadas áreas com presença abundante de osso, cartilagem e tecido adiposo que são frequentes nos tumores mistos por apresentarem proliferação de um componente mesenquimal com um padrão expansivo. O trabalho foi realizado atendendo aos princípios éticos fundamentais da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e do decreto nº 6.899 de julho de 2009, e com as normas expedidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Aprovado pela “*Comissão de Ética no Uso de Animais*” da UFMG, sob nº 251/2018.

2.4 Avaliação das fibras colágenas

Para a análise quantitativa dos parâmetros de fibras colágenas e de regiões celulares nas imagens foi utilizado o software em linguagem Python *PyFibre - Python Fibrous Image Analysis Toolkit* (Garcia *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2020). Os valores das métricas avaliadas nos cortes histológicos medidos como mama normal foram utilizados como parâmetro de comparação entre os demais casos. Para a avaliação das fibras colágenas e das características celulares foram utilizadas lâminas coradas em H&E representativas para cada caso (tons rosas e roxos na primeira linha). O sinal de SHG (em verde) é coletado na mesma lâmina e consiste em um sinal exclusivo das fibras colágenas que pela conformação estrutural são as únicas capazes de emitir este sinal no tecido avaliado. A fotoluminescência ou TPEF consiste no sinal emitido pelo componente celular corado com eosina (em vermelho).

Posteriormente, o programa sobrepõe os sinais coletados a fim de avaliar os componentes celulares e das fibras colágenas, extraindo as 6 métricas selecionadas para este estudo: cobertura do segmento celular (Cell segment coverage), cobertura do segmento de fibra (Fibre segment coverage), circularidade do segmento celular (Cell segment circularity), orientação das fibras (fibre segment SHG coherence), número de fibras (No. Fibre) e comprimento médio da fibra (mean fibre length). Para as duas primeiras métricas, cobertura do segmento celular e do segmento de fibras, foram mensuradas as áreas preenchidas por cada segmento e distribuídos os dados dentro de uma faixa de zero a um de acordo à proporção de área ocupada por cada componente. Para a primeira métrica, cobertura do segmento de fibras, zero foi designado a áreas complemente preenchidas por células e um para áreas completamente preenchidas por fibras colágenas. Para a segunda métrica, cobertura do segmento celular, zero foi designado a áreas completamente preenchidas por fibras colágenas e um a áreas completamente preenchidas por células. Para a terceira métrica, circularidade do segmento celular, foi designado o valor de zero a grupamentos celulares não circulares e um a grupamentos celulares circulares. Para a quarta métrica, organização das fibras de colágeno, foi estabelecida uma faixa que varia de zero a um, em que zero foi designado a fibras orientadas aleatoriamente e um a fibras orientadas em uma direção única no tecido (Garcia *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2020). Para a quinta métrica, número de fibras colágenas, foi realizada a contagem individual das fibras colágenas extraídas pelo programa nas áreas avaliadas. Finalmente, para a sexta métrica, comprimento médio das fibras de colágeno, foi realizada a mensuração do tamanho médio em μm nas áreas avaliadas.

2.5 Análise estatística

As análises foram realizadas no programa computacional Prism® (versão 6,0, GraphPad®, San Diego, CA, Estados Unidos) para sistema operacional Microsoft® Windows®. Para todas as análises um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi realizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) e comparações múltiplas usando o teste HSD (honestly significant difference) de Tukey para a comparação das métricas entre os grupos. Também, foram realizadas análises de correlação de Pearson para os dados paramétricos e Spearman para os dados não paramétricos. Neste trabalho foram realizadas correlações entre os marcadores Ki67, COX2, HER2, RP e RE e as métricas coberturas do segmento celular, cobertura do segmento de fibra, circularidade do segmento celular, orientação das fibras, número de fibras e comprimento médio da fibra. Também foi implementada curva de Kaplan–Meier e o teste de Mantel–Cox log rank para a avaliação da sobrevida relacionada a cada métrica do colágeno. Por último, foi realizada uma análise univariada para a sobrevida associada a cada métrica, incluindo somente animais tratados apenas com cirurgia.

3. Resultados

3.1 Caracterização das amostras

As características dos pacientes como idade, grau histológico, subtipo molecular e tempo de sobrevida são mostrados na Tabela 1. Para este estudo foram selecionados um total de 46 casos: 32,6% TMB (n=15), 34,7% CTM (n=16) e 32,6% CTMM (n=15). A média de idade para os TMB foi de 11,4 anos, para os CTM foi de 11,3 anos e para os CTMM foi de 10,4 anos. A graduação histológica foi realizada somente nos tumores malignos, sendo que, apenas 46% dos CTM (n=7) e 60% dos

CTMM (n=9) apresentaram o número requerido de áreas de invasão. O perfil molecular foi em sua maioria luminal A para os 3 tipos tumorais, 93,3% dos TMB (n=14), 87,5% dos CTM (n=14) e 93,3% dos CTMM (n=14) se encaixaram dentro de esta classificação. Por último, a média de sobrevida foi calculada apenas para os grupos CTM e CTMM, já que esta avaliação não é realizada em pacientes portadores de tumores benignos. Para os casos CTM a média de sobrevida foi de 833 dias e para os CTMM foi de 691, com uma diferença de 142 dias entre os grupos, sendo menor a média de sobrevida nos casos associados a metástase linfonodal.

Tipo histológico	n		Grau histológico		Subtipo molecular		Sobrevida (dias)
			I	II	Luminal A	Luminal B	
TMB	15	11,4	NA	NA	13	1	NA
CTM	16	11,3	5	2	11	3	833
CTMM	15	10,4	7	2	10	4	691

Tabela 1. Dados descritivos dos 46 casos avaliados. TMB: tumor misto benigno, CTM: carcinoma em tumor misto sem metástase, CTMM: carcinoma em tumor misto com metástase, NA: Não se aplica.

3.2 Análise das imagens e parâmetros extraídos

A Figura 1 apresenta imagens representativas dos cortes histológicos mamários avaliados. Os tipos histológicos nas colunas são indicados como MN, TMB, CTM e CTMM. As linhas de um a três mostram as regiões selecionadas para medidas (coloração H&E observada pela microscopia óptica), o sinal emitido pelo colágeno

(SHG) e o sinal emitido pela autofluorescência da eosina (TPEF) nessas regiões selecionadas. As linhas de quatro a sete apresentam as informações extraídas (angle, fibre extraction, fibre network e cell network, respectivamente) para a obtenção das métricas do estudo. Observe na segunda linha o sinal de SHG em verde emitido pelo colágeno e os espaços em preto que representa a ausência de fibras colágenas. Pode ser observado no sinal captado do SHG, que a presença de regiões com menor quantidade de fibras colágenas (sinal fraco) ou descontinuidade do colágeno são encontradas nos grupos carcinomatosos (observe a imagem do CTM). Na quarta linha (angle), os distintos ângulos de cada fibra estão representados por cores variadas, sendo que quanto mais homogênea for uma região em sua gama de cores, há um maior número de fibras orientadas em uma mesma direção, como é observado no CTM. Por último, as imagens do segmento de fibras (fibre network) e do segmento de células (cell network) mostram que os CTM e CTMM apresentam menor quantidade de fibras e maior quantidade de células em comparação à MN e TMB. Os detalhes das métricas e análises das imagens de MN, TMB, CTM e CTMM estão descritos na seção “Materiais e métodos”.

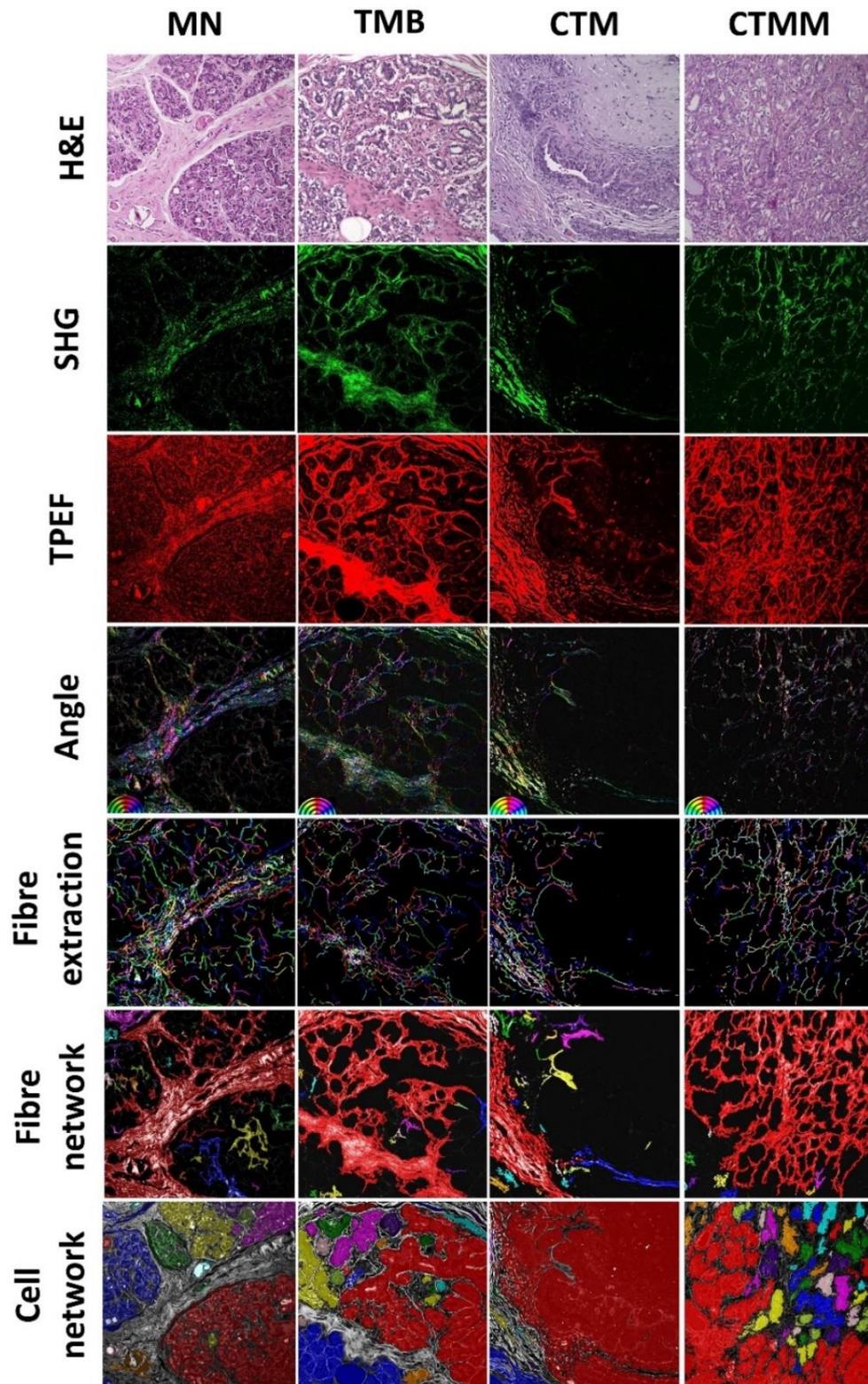


Figura 1. Imagens representativas em corte transversal de cortes histológicos de tecido mamário canino corados com hematoxilina e eosina (H&E), sinal de segundo harmônico (SHG), sinal de fotoluminescência (TPEF), representação da extração da rede de fibras e da

rede de células dos grupos: mama normal (MN), tumor misto benigno (TMB), carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar (CTM) e com metástase ganglionar (CTMM). Cell segment – Segmento celular. Fibre segment – Segmento de fibras. Angle – ângulo das fibras. Fibres – fibras.

3.3 O aumento do grau de alinhamento e a diminuição na quantidade das fibras colágenas são características relacionadas à progressão da doença

A figura 2a representa os resultados da avaliação da orientação das fibras de colágeno (fibre segment SHG coherence) nos grupos do estudo. A orientação das fibras colágenas na MN não apresentou diferenças significativas quando comparada com a orientação das fibras no TMB, o que sugere que as fibras se encontram orientadas em várias direções, visto que, células normais ou em proliferação do tipo benigno não estão associadas a alterações na orientação das fibras. Quando comparados TMB e CTM, as fibras se apresentaram mais organizadas no caso do CTM ($p < 0,0001$), o seja, em determinadas regiões o colágeno se alinhava e orientava em uma única direção, como pode ser observado na quarta fileira da figura 1 em que a cor verde predomina perante a outras. Entre MN e CTM, as fibras apresentam maior organização no CTM ($p = 0,0010$). Não obstante, os casos de CTMM não apresentaram fibras maior organização das fibras em relação aos outros grupos tumorais.

Também foram mensurados o número das fibras colágenas nos 4 grupos avaliados (figura 2b). Nesta avaliação, a MN apresentou maior número de fibras quando comparada com os grupos TMB, CTM e CTMM ($p < 0,0001$). O TMB apresentou maior número de fibras quando comparado com CTM e CTMM ($p < 0,0001$). Os grupos CTM e CTMM não apresentaram diferenças significativas no número de fibras.

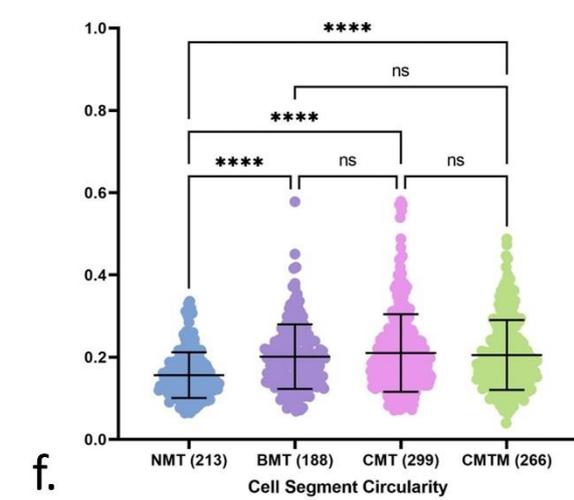
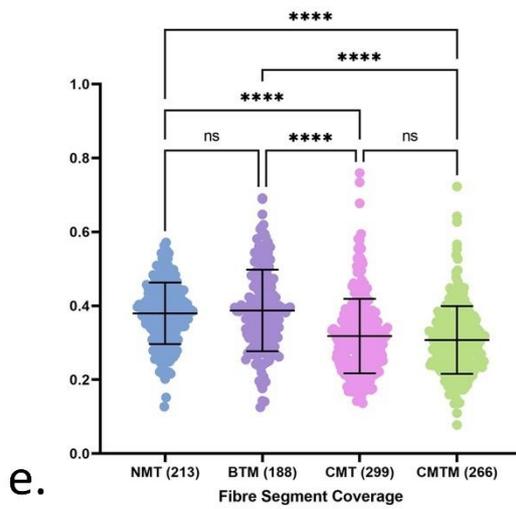
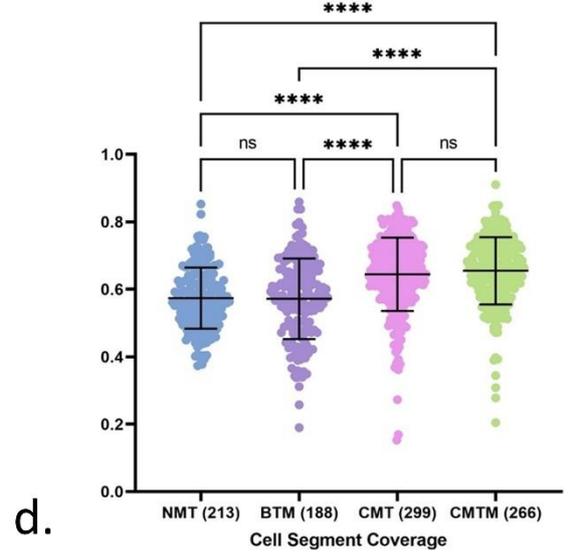
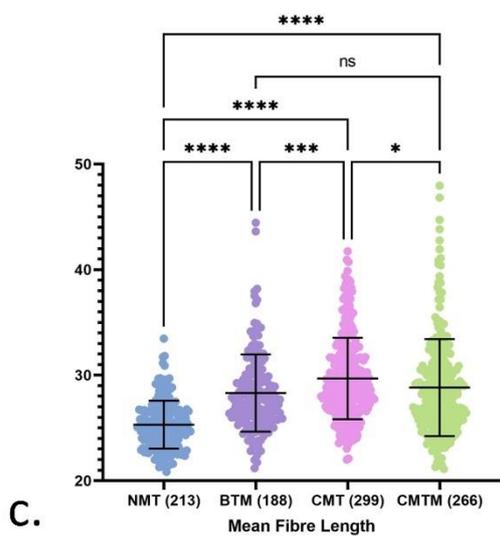
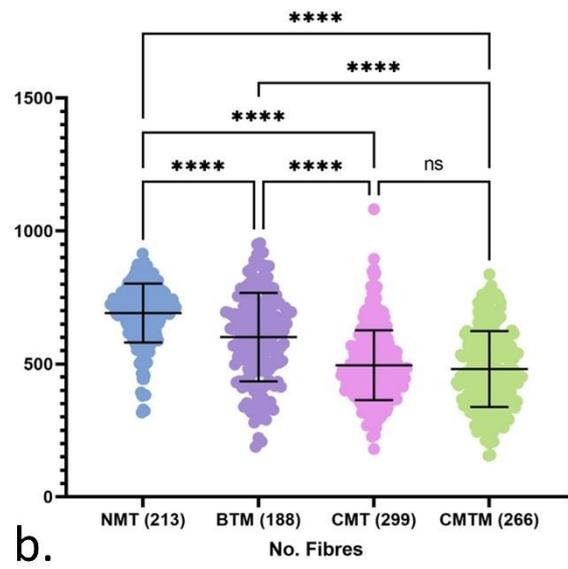
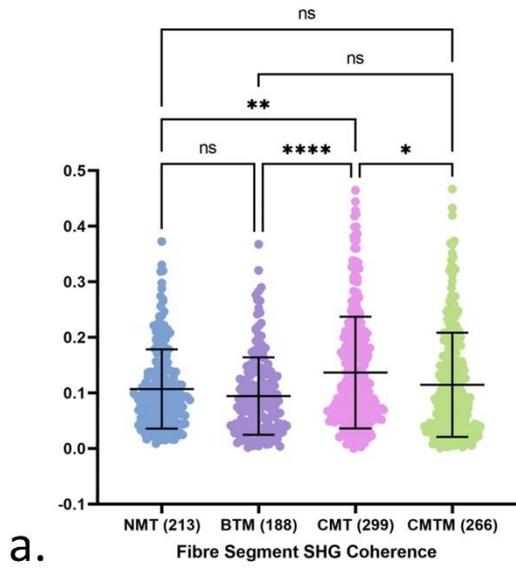


Figura 2. Gráficos Scatter plot apresentando as 6 métricas selecionadas para os 4 grupos do estudo. Métricas: Orientação das fibras (fibre segment SHG coherence), número de fibras (No. Fibre), comprimento médio da fibra (mean fibre length), cobertura do segmento celular (Cell segment coverage), cobertura do segmento de fibra (Fibre segment coverage) e circularidade do segmento celular (Cell segment circularity). Grupos: mama normal (MN/NMT), tumor misto benigno (TMB/BTM), carcinoma em tumor misto sem metástase ganglionar (CTM/CMT), CTMM: carcinoma em tumor misto com metástase ganglionar (CTMM/CMTM). Os números entre parênteses indicam a quantidade de imagens adquiridas para cada grupo avaliado. Significância do valor p: $p < 0,05$ são denotados como (*), $p < 0,01$ são indicados como (**), $p < 0,001$ são indicados como (***) e $p < 0,0001$ são indicados como (****).

3.4 Fibras de colágeno mais curtas se associam à presença de metástase ganglionar

A figura 2c representa os resultados da avaliação do comprimento médio das fibras de colágeno (mean fibre length) nos grupos do estudo. A comparação do tamanho médio das fibras entre os 4 grupos (figura 2) demonstrou que a MN apresenta menor comprimento médio das fibras quando comparados com TMB, CTM e CTMM ($p < 0,0001$). Quando comparados o TMB e o CTMM não foram encontradas diferenças no tamanho das fibras. Em contrapartida, o TMB apresentou fibras mais curtas em relação ao CTM ($p = 0,0005$). Finalmente, foi possível observar que o CTM apresentou fibras com maior comprimento em relação ao CTMM ($p = 0,0330$).

3.5 A quantidade de áreas cobertas pelos componentes celulares e de fibras são características preservadas nos tumores mistos

Os resultados da avaliação da cobertura do segmento celular e do segmento de fibras dos grupos do estudo estão representados nas figuras 2d e 2e. Quando foram comparadas as áreas de cobertura celular entre MN e TMB não foram encontradas diferenças. Por outro lado, a MN apresentou menor número de áreas cobertas por células em relação aos grupos CTM e CTMM ($p = <0,0001$). Quando comparamos os grupos carcinomatosos não foi encontrada diferença significativa na cobertura do segmento celular.

Da mesma forma, a avaliação da cobertura do segmento de fibras ou a quantidade da área medida coberta por fibras colágenas (figura 2e) demonstrou que os grupos carcinomatosos apresentam proporções similares na quantidade de áreas coberta por fibras colágenas. Na avaliação, MN e TMB não apresentaram diferenças significativas. A MN apresentou maior quantidade de áreas cobertas por fibras colágenas quando comparado com CTM e CTMM ($p < 0,0001$).

3.6 Circularidade do segmento celular é uma característica associada à proliferação neoplásica

A figura 2f representa os resultados da avaliação da circularidade do segmento celular (cell segment circularity) nos grupos do estudo. O grupo MN apresentou menor circularidade do segmento celular quando comparado com TMB, CTM e CTMM ($p < 0,0001$). Não houve diferenças significativas entre os grupos TMB, CTM e CTMM.

4. Elevada expressão de COX2 apresenta correlação com menor tamanho da fibra colágena

Foi realizado o estudo dos marcadores imuno-histoquímicos COX2, Ki67, HER2, RE e RP nos casos de TMB, CTM e CTMM (tabela 2, figura 3). Também foram feitas correlações entre todas as métricas das fibras colágenas obtidas mediante o SHG com os resultados dos marcadores imuno-histoquímicos. Nesta análise não foram encontradas correlações para os marcadores, Ki67, HER-2, RE e RP com as alterações das fibras. No entanto, para o marcador COX2 foi observada uma correlação com o comprimento médio da fibra colágena (figura 4). Onde a distribuição maior que 30% se relacionou com um menor comprimento médio da fibra nos tumores mistos ($p= 0,045$).

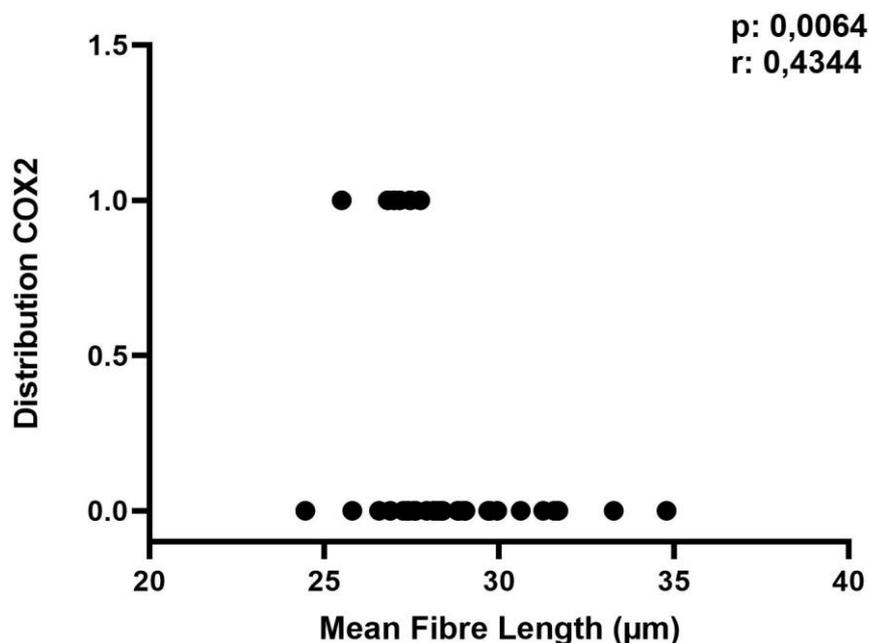


Figura 4. Avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos em tumores mistos da glândula mamária canina. Correlação entre a expressão de COX2 dos casos carcinomatosos e o comprimento médio da fibra (Mean fibre length). Distribuição de COX2: 0 =/ \leq 30. 1: $>$ 30.

4. Discussão

Neste trabalho observamos fibras colágenas mais organizadas nos CTM quando comparados com os TMB e a MN (figura 2a). O que já foi observado pelo nosso grupo em 2021, onde todos os subtipos histológicos neoplásicos apresentaram fibras colágenas mais alinhadas e organizadas em comparação com a mama normal (Garcia *et al.*, 2021). Da mesma forma diversos padrões do colágeno têm sido descritos em outros trabalhos com o nome de TACS (Tumor-Associated Collagen Signatures) ou padrões do colágeno no câncer (Dravid U & Mazumder, 2018; Rueden *et al.*, 2009).

Os TACS ou padrões do colágeno no câncer se dividem em 3. No TACS1 o colágeno denso circunda o tumor em estágio inicial em uma distribuição aleatória, o que poderia explicar as fibras colágenas desorganizadas no TMB e MN. Já o TACS2 as fibras continuam circundando as células tumorais e se orientam paralelamente ao tumor, padrão de organização que foi encontrado no CTM, onde as fibras apresentaram maior organização em relação aos outros grupos do nosso estudo. Por último, no TACS3 as fibras passam a se organizar perpendicularmente ao limite do estroma do tumor, o que coincide com o resultado do CTMM no qual as fibras colágenas apresentaram maior organização em relação ao CTMM (Dravid U & Mazumder, 2018; Rueden *et al.*, 2009).

Ao comparar o comprimento médio das fibras colágenas foi possível observar que o CTMM apresentou fibras com menor comprimento em relação ao CTM. De acordo com a literatura o rompimento das fibras colágenas se dá principalmente pela atividade de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases que desempenha atividade pró-tumoral no contexto do câncer favorecendo assim a invasão das células neoplásicas (Garcia *et al.*, 2021; Ricard-Blum, 2011; Xu *et al.*, 2019). O

nosso grupo também observou dados semelhantes no trabalho anterior em que as áreas invasoras do CTM apresentaram fibras colágenas mais curtas em relação às áreas in situ do CTM. Nesse sentido, os CTMM são um grupo caracterizado por um maior número de áreas invasoras com rompimento de membrana basal e do tecido conjuntivo adjacente o que termina na diminuição do comprimento das fibras colágenas.

Na contagem do número de fibras colágenas os nossos dados mostraram que a MN apresentou maior número de fibras em relação aos grupos tumorais, o que pode ser justificado pelas características histológicas da mama na cadela na fase de involução ou pelas diversas fases estrais das pacientes avaliadas (ciclo estral ou reprodutivo na fêmea). Por esse motivo consideramos que o maior número de fibras na mama normal em relação aos tipos TMB, CTM e CTMM não apresenta um significado relevante.

Por outro lado, na comparação entre os grupos carcinomatosos CTM e CTMM apresentaram a mesma quantidade de fibras e um menor número quando comparado com o TMB. Os TMB se caracterizam por uma maior proliferação do componente estromal em comparação ao componente epitelial resultando em mais tecido conjuntivo, diferente do que acontece no CTM e CTMM que são caracterizados pela proliferação exacerbada do seu componente epitelial (Bertagnolli *et al.*, 2011; Cassali *et al.*, 2020).

O TMB, CTM e CTMM apresentaram maior cobertura de célula e menor cobertura de fibras colágenas em comparação à MN. Entre os tumores mistos, percebemos que o TMB apresenta menor cobertura de células e maior cobertura de fibras colágenas em relação ao CTM e ao CTMM. Os dados cobertura do segmento celular e do segmento de fibras são resultados que coincidem com as características

específicas das neoplasias e principalmente com natureza dos tumores mistos. (Cassali *et al.*, 2011, 2020; Garcia *et al.*, 2021).

Na avaliação da circularidade do segmento celular os TMB, CTM e CTMM apresentaram áreas mais circulares em comparação à MN (figura 2f). Posto que, histologicamente os tumores mistos são caracterizados pela proliferação epitelial em nódulos ou focos e por isso é esperado que não exista diferenças entre os grupos do estudo (Cassali *et al.*, 2020).

Por último, observamos que a distribuição de COX2 nos carcinomas em tumores mistos apresentaram uma moderada correlação inversa com o comprimento das fibras colágenas (figura 4). Na literatura tem sido relatado que a expressão de COX-2 está relacionada à maior agressividade, pior prognóstico, proliferação celular, inibição da apoptose, indução da angiogênese e modulação do sistema imune (Araújo *et al.*, 2016; Denkert *et al.*, 2001; Doré, 2011; Veloso *et al.*, 2020). Por esse motivo a inibição de COX2 tem sido implementada em alguns tipos de neoplasias nas espécies humana e canina trazendo melhoras na resposta ao tratamento (Cassali *et al.*, 2017, 2020).

5. Conclusão

A utilização da microscopia por geração de segundo harmônico associada à microscopia por absorção de dois fótons na avaliação das fibras colágenas permitiu demonstrar diferenças significativas na organização do colágeno em neoplasias mamárias mistas caninas em relação à mama normal. Foi possível verificar que os casos carcinomatosos apresentaram menor número de fibras colágenas. Em relação ao comprimento médio das fibras, os carcinomas em tumores mistos que evoluíram com metástase ganglionar apresentaram um menor comprimento. Também foi possível observar que antes do aparecimento da metástase ganglionar as fibras começam a se alinhar, facilitando, assim, a saída das células cancerosas e conseqüentemente a progressão da doença. Foi possível observar que a expressão de COX2 apresenta correlação inversa com o comprimento das fibras. Assim, as correlações estabelecidas com estes marcadores demonstram que a utilização de técnicas sensíveis representa uma ferramenta útil e promissora.

6. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelas agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

7. História

A parceria entre o Laboratório de Patologia Comparada (LPC) e o Laboratório de Biofotônica iniciou-se no ano 2018, quando a pesquisadora Ana Paula Vargas

Garcia deu início ao seu mestrado em patologia na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no Instituto de Ciências Biológicas (ICB). A Ana Paula Vargas Garcia se vinculou ao LPC sob a orientação do Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali e por meio do Aloísio Miguel Garcia, primo dela, conheceu a Profa. Dra. Ana Maria de Paula do departamento de Ciências Exatas da UFMG. O grupo de pesquisa do LPC é focado no estudo das neoplasias mamárias humanas e caninas. O grupo tem contribuindo consideravelmente para a patologia mamária na medicina veterinária. O grupo de pesquisa do Laboratório de Biofotônica liderada pela Profa. Dra. Ana Maria de Paula conta com uma linha de pesquisa focada no estudo de efeitos ópticos não lineares em tecidos biológicos, especificamente o colágeno. No mesmo ano de 2018 foi estabelecido um vínculo entre os laboratórios e elaborada a primeira proposta para avaliar as fibras colágenas em mama normal, carcinoma em tumor misto, carcinoma papilar, carcinoma tubular e carcinoma sólido da glândula mamária canina, com o intuito de iniciar a padronização da técnica de microscopia por excitação por dois fótons. Em 2021, como resultado da parceria foi publicado na *Scientific Reports* o primeiro trabalho intitulado “*Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics*”. Posteriormente, com a vinculação da autora principal deste trabalho, Daiana Y.O Taborda, surgiu a proposta de avaliar os tumores mistos da glândula mamária canina, tipo histológico mais frequente na rotina diagnóstica em diferentes países. O grupo de pesquisa do LPC é pioneiro em estudos focados em TMB e CTM e o único grupo que avaliou as fibras colágenas por meio de microscopia multifotônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (artigo)

- Araújo, M. R., Campos, L. C., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2016). HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science*, 106, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.020>
- Bertagnolli, A. C., Ferreira, E., Dias, E. J., & Cassali, G. D. (2011). Canine mammary mixed tumours: Immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. *Australian Veterinary Journal*, 89(8), 312–317. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00803.x>
- Cassali, G. D., Damasceno, K. A., Bertagnolli, A. C., Estrela-Lima, A., Lavallo, G. E., Di Santis, G. W., De Nardi, A. B., Fernandes, C. G., Cogliati, B., Sobral, R., Amorim da Costa, F. V., Ferreira, E., Salgado, B. S., Campos, C. B., D'Assis, M. J. M. H., Silva, L. P., Machado, M. C. A., Firmo, B. F., Nunes, F. C., & Nakagaki, K. Y. R. (2017). Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: Benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. In *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* (Vol. 10, Número 3, p. 87–99). Brazilian Association of Veterinary Pathology. <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p87-99>
- Cassali, G. D., Jark, P. C., Gamba, C., Damasceno, K. A., Estrela-Lima, A., De Nardi, A. B., Ferreira, E., Horta, R. S., Firmo, B. F., Sueiro, F. A. R., Rodrigues, L. C. S., & Nakagaki, K. Y. R. (2020). Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. In *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* (Vol. 13, Número 3, p. 555–574).

<https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574>

Cassali, Geovanni, Damasceno, K., Bertagnolli, A., Estrela-Lima, A., Lavallo, G., Santis, G., Nardi, A., Fernandes, C., Cogliati, B., Sobral, R., Costa, F., Ferreira, E., Salgado, B., Campos, C., D'Assis, M., Silva, L., Machado, M., Firmo, B., Nunes, F., & Nakagaki, K. (2017). Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Braz. J. Vet. Pathol.*, *10*(3), 87–99.

<https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v10i3p87-99>

de Araújo, M. R., Campos, L. C., Ferreira, E., & Cassali, G. D. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *29*(5), 1360–1367. <https://doi.org/10.1111/JVIM.13576>

Denkert, C., Köbel, M., Berger, S., Siegert, A., Leclere, A., Trefzer, U., & Hauptmann, S. (2001). Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Research*, *61*(1), 303–308.

Doré, M. (2011). Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Veterinary Pathology*, *48*(1), 254–265. <https://doi.org/10.1177/0300985810379434>

Dravid U, A., & Mazumder, N. (2018). Types of advanced optical microscopy techniques for breast cancer research: a review. In *Lasers in Medical Science* (Vol. 33, Número 9, p. 1849–1858). Springer London. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2659-6>

Egeblad, M., Rasch, M. G., & Weaver, V. M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(5), 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>

- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195–4200.
<https://doi.org/10.1242/jcs.023820>
- Garcia, A. P. V., Reis, L. A., Nunes, F. C., Longford, F. G. J., Frey, J. G., de Paula, A. M., & Cassali, G. D. (2021). Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85104-w>
- Giussani, M., Merlino, G., Cappelletti, V., Tagliabue, E., & Daidone, M. G. (2015). Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.012>
- Gonçalves, A. D. B. B., de Pinho, T. C. R., Toledo, F. A. O., Balabram, D., Ferreira, E., Campos, M. R. A., & Cassali, G. D. (2021). Extracapsular extension and tumor implants in lymph nodes with canine mammary carcinoma metastasis: Study of the impact on survival. *Research in Veterinary Science*, *139*, 87–93.
<https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2021.07.010>
- Insua-Rodríguez, J., & Oskarsson, T. (2016). The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *97*, 41–55.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, *501*(7467), 346–354.
<https://doi.org/10.1038/nature12626>
- Nunes, F. C., Campos, C. B., Teixeira, S. V., Bertagnolli, A. C., Lavallo, G. E., Cassali, G. D., Nunes, F. C., Campos, C. B., Teixeira, S. V., Bertagnolli, A. C., Lavallo, G.

- E., & Cassali, G. D. (2018). Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(6), 1714–1722.
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-10217>
- Nunes, Fernanda Camargo, Damasceno, K. A., de Campos, C. B., Bertagnolli, A. C., Lavallo, G. E., & Cassali, G. D. (2019). Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Veterinary and Animal Science*, 7(July 2018), 100039.
<https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.003>
- Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html>
- Paoloni, M. C., & Khanna, C. (2007). Comparative Oncology Today. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 37(6), 1023--v. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.08.003>
- Reis, L. A., Garcia, A. P. V., Gomes, E. F. A., Longford, F. G. J., Frey, J. G., Cassali, G. D., & de Paula, A. M. (2020). Canine mammary cancer diagnosis from quantitative properties of nonlinear optical images. *Biomedical Optics Express*, 11(11). <https://doi.org/10.1364/boe.400871>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rueden, C. T., Conklin, M. W., Provenzano, P. P., Keely, P. J., & Eliceiri, K. W. (2009). Nonlinear optical microscopy and computational analysis of intrinsic signatures in breast cancer. *Proceedings of the 31st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: Engineering the Future of Biomedicine, EMBC 2009*, 4077–4080.

<https://doi.org/10.1109/IEMBS.2009.5334523>

Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer.

In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 221).

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>

Xu, S., Xu, H., Wang, W., Li, S., Li, H., Li, T., Zhang, W., Yu, X., & Liu, L. (2019). The

role of collagen in cancer: From bench to bedside. In *Journal of Translational*

Medicine (Vol. 17, Número 1). BioMed Central Ltd.

<https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>

8. Referências bibliográficas (dissertação)

ARAÚJO, M. R. et al. HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. *Research in Veterinary Science*, v. 106, p. 121–130, 1 jun. 2016.

ARAÚJO, M. R. DE et al. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 29, n. 5, p. 1360–1367, 1 set. 2015.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine mammary mixed tumours: Immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. ***Australian Veterinary Journal***, v. 89, n. 8, p. 312–317, ago. 2011.

CASSALI, G. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. ***Braz. J. Vet. Pathol.***, v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017.

CASSALI, G. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. ***Brazilian Journal of Veterinary Pathology***, 2011.

CASSALI, G. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. ***Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***, v. 55, n. 2, 2019.

CASSALI, G. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. ***Brazilian Journal of Veterinary Pathology***, 2020.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. ***Annals of Oncology***, v. 26, n. 8, 2015.

CONKLIN, M. W. et al. Collagen alignment as a predictor of recurrence after ductal carcinoma in situ. ***Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention***, v. 27, n. 2, p. 138–145, 1 fev. 2018.

DAI, J. et al. Biointerface mediates cytoskeletal rearrangement of pancreatic cancer cell and modulates its drug sensitivity. ***Colloids and Interface Science Communications***, v. 35, 1 mar. 2020.

DENKERT, C. et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. ***Cancer Research***, v. 61, n. 1, p. 303–308, 1 jan. 2001.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. ***Veterinary Pathology***, v. 48, n. 1, p. 254–265, jan. 2011.

DRAVID U, A.; MAZUMDER, N. Types of advanced optical microscopy techniques for breast cancer research: a review. ***Lasers in Medical Science***, v. 33, n. 9, p.

1849-1858, 1 dec. 2018.

DRIFKA, C. R. *et al.* Comparison of Picrosirius Red Staining With Second Harmonic Generation Imaging for the Quantification of Clinically Relevant Collagen Fiber Features in Histopathology Samples. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 64, n. 9, p. 519–529, 1 sep. 2016.

DRUZHKOVA, I. *et al.* Expression of emt-related genes in hybrid e/m colorectal cancer cells determines fibroblast activation and collagen remodeling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–26, 1 nov. 2020.

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

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

GARCIA, A. P. V. *et al.* Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.

GIUSSANI, M. *et al.* Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 3–10, 2015.

GONÇALVES, A. D.B.B. *et al.* Extracapsular extension and tumor implants in lymph nodes with canine mammary carcinoma metastasis: Study of the impact on survival. **Research in Veterinary Science**, v. 139, p. 87–93, 1 out. 2021.

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016.

JUNTTILA, M. R.; SAUVAGE, F. J. DE. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, 2013.

MISDORP, W. *et al.* Canine malignant mammary tumors. 3. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Veterinary pathology**, v. 10, n. 3, p. 241–56, 26 jun. 1973.

NIETO, A. *et al.* Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: Clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 3, p. 239–247, 2000.

NUNES, F. C. *et al.* Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.

NUNES, F. C. *et al.* Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, n. July 2018, p. 100039, 2019.

NUNES, M. M. *et al.* Histopathological and immunohistochemical characteristics of malignant adenomyoepithelioma in a cat: case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 73, n. 6, 2021.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organisation**, p. 1–52, 1980.

PANKO, W. B. *et al.* Estrogen receptors in canine mammary tumors. **Cancer Research**, v. 42, n. 6, 1982.

PAOLONI, M. C.; KHANNA, C. Comparative Oncology Today. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 37, n. 6, p. 1023- v, 2007.

REIS, Luana A. *et al.* Canine mammary cancer diagnosis from quantitative properties of nonlinear optical images. **Biomedical Optics Express**, v. 11, n. 11, 2020.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, 2011.

RUEDEN, C. T. *et al.* Nonlinear optical microscopy and computational analysis of intrinsic signatures in breast cancer. **2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2009**, p. 4077–4080, 2009.

UENO, T. *et al.* Progesterone receptor expression in proliferating cancer cells of hormone-receptor-positive breast cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 40, n. 10, 1 nov. 2018.

VELOSO, E. S. *et al.* Diverse roles of epidermal growth factors receptors in oral and cutaneous canine melanomas. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, 2020.

VENNIN, C. *et al.* Transient tissue priming via ROCK inhibition uncouples pancreatic cancer progression, sensitivity to chemotherapy, and metastasis. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 384, 5 abr. 2017.

XIAO, Y.; YU, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 221, p. 107753, 2021.

XU, S. *et al.* The role of collagen in cancer: From bench to bedside. **Journal of Translational Medicine**. v. 17, n. 1, p. 1-22, 2019.

ZHOU, Z. H. *et al.* Reorganized collagen in the tumor microenvironment of gastric cancer and its association with prognosis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 8, 2017.

6. ANEXOS

Anexo 01: Análises de KI67

Quantitativo por meio da contagem de células marcadas → Índice proliferativo:

Índice proliferativo	Valores
Baixo índice proliferativo	Menor a 10%
Índice proliferativo intermediário	10 – 25%
Alto índice proliferativo	Maior a 25%

Anexo 02: Análises de COX2

- Avaliação semiquantitativo por estimativa de porcentagem de células marcadas em 5 campos de 400x;
- Distribuição (0 a 4) x intensidade (0 a 3) → Escore de entre 0-12.

Distribuição	Intensidade
0 (0%)	0: Ausência
1 (<10%)	1: Marcação fraca (+)
2 (10-30%)	2: Marcação moderada (++)
3 (31-60%)	3: Marcação forte (+++)
4 (>61%)	-

- Distribuição (0 a 4) x Intensidade (0 a 3):

Distribuição da marcação	Intensidade da Marcação			
	0 (Ausente)	1 (Fraca)	2 (Moderada)	3 (Forte)
0 (0%)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1 (<10%)	Negativo	Escore 1	Escore 2	Escore 3
2 (10-30%)	Negativo	Escore 2	Escore 4	Escore 6
3 (31-60%)	Negativo	Escore 3	Escore 6	Escore 9
4 (>61%)	Negativo	Escore 4	Escore 8	Escore 12

Anexo 03: Estadiamento clínico

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

Estadiamento clínico de tumores mamários caninos. **T**: tamanho tumoral (T1 de 0-3 cm; T2: 3-5cm; T3: >5cm); **N**: Metástase em linfonodos regionais (N0: livre; N1: metastático); **M**: metástases à distância (M0: sem metástase; M1: com metástase).

Anexo 04: Certificado CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 251/2018

Título do projeto: AVALIAÇÃO DA ARQUITETURA E ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Geovanni Dantas Cassali

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: **Decisão Final- Adendo Aprovado**

Pedido de adendo aprovado na reunião on-line do dia 22/03/2021.

Belo Horizonte, 22/03/2021.

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

7. APÊNDICES

PARTICIPAÇÕES CIENTÍFICAS NO PERÍODO DE MESTRADO

a. Resumos publicados em anais de eventos

Título: Carcinoma Neuroendócrino da Glândula mamária em Gatas: Relato de caso.

Tipo: Resumo

Autores: Taborda, D. Y. O.; Viscone, E. A.; Nakagaki, K.Y. R.; Cassali, G.D.

Evento: 6º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XX Encontro Nacional de Patologia Veterinária (CBPV/ENAPAVE)

Data: 26 a 30 de julho de 2021

Formato: Remoto

Local: Brasil

b. Resumos publicados em anais de eventos – relacionados à dissertação

Título: Changes in the collagen organization may be related to lymph node metastasis in canine mammary carcinomas

Tipo: Publicação de resumo

Status: Aceito para publicação e apresentação

Autores: Taborda, D.O; Garcia, A.P.V; Reis, L.A; Ribeiro, B.R.M; Cassali, G.D; de Paula, A. M.

Evento: 51ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e 46ª Congresso da Sociedade Brasileira de Biofísica (2022)

Data: 5 a 8 de setembro de 2022

Local: Hotel Majestic em Águas de Lindóia, SP, Brasil.

c. Cursos adicionais

Nome: Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório

Carga horária: 60 horas

Período do Curso: 18/06/2021 a 26/09/2021

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP)

Área de Conhecimento: Manejo de Animais

Nome: II Curso online de histopatologia mamária canina e felina

Carga horária: 12 horas

Período do Curso: 29 e 30 de maio de 2021

Instituição: Laboratório de Patologia Comparada (LPC) & Celulavet

Área de Conhecimento: Patologia mamária