

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

CARIOMETRIA E PADRÃO DE DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA
CONTRIBUEM NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
TUMORAÇÕES MAMÁRIAS EM GATOS DOMÉSTICOS
(*FELIS CATUS*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL

CARIOMETRIA E PADRÃO DE DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA
CONTRIBUEM NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
TUMORAÇÕES MAMÁRIAS EM GATOS DOMÉSTICOS
(*FELIS CATUS*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

SÃO PAULO

2023

Santos, Anderson Amaro Melo dos.

Cariometria e padrão de deposição colagênica contribuem no diagnóstico diferencial de tumorações mamárias em gatos domésticos (*Felis catus*) / Anderson Amaro Melo dos Santos. - 2023.

32 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Felinos. 2. Matriz extracelular. 3. Morfometria. 4. Oncologia veterinária. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

ANDERSON AMARO MELO DOS SANTOS

**CARIOMETRIA E PADRÃO DE DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA
CONTRIBUEM NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE
TUMORAÇÕES MAMÁRIAS EM GATOS DOMÉSTICOS
(*FELIS CATUS*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Profa. Dra. Eliana Aparecida Perrone
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Profa. Dra. Adriana Tomoko Nishiya
Universidade Anhembí Morumbi - UAM

_____/_____/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Profa. Dra. Cristiane Lopes

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – SANTA CASA

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier pela orientação prestada na elaboração desta tese e que ao longo dos anos sempre se mostrou presente, incentivando e colaborando nas minhas atividades profissionais. O meu mais profundo respeito, admiração e gratidão por sua competência, estendendo esse agradecimento à sua esposa e minha professora, Dra. Silvia Regina Kleeb.

À CAPES-PROSUP pela bolsa, modalidade taxa, recebida para a realização deste programa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista, pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos meus pais, Aderson Amaro dos Santos e Marinete Severino de Melo Amaro dos Santos, e às minhas irmãs, Tatiane Melo dos Santos e Elaine Melo dos Santos. Gratidão pela base oferecida e por todos os incentivos para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

À minha namorada, Juliana Santana Campos, por toda paciência e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Vanessa Xavier e Renato Piccolo, por todas as parcerias que pudemos realizar ao longo desses anos.

Agradeço a todos que de alguma forma possam ter cooperado na realização desta tese.

Cariometria e padrão de deposição colagênica contribuem no diagnóstico diferencial de tumorações mamárias em felinos domésticos (*Felis catus*)

Anderson A. M. dos Santos¹, José Guilherme Xavier¹

ABSTRACT.- Santos, A.A.M.; Xavier, J.G. Karyometrics and collagen deposition pattern contribute to the differential diagnosis of mammary tumors in domestic felines (*Felis catus*).

Pesquisa Veterinária Brasileira. Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista,

Rua Doutor Bacelar, 1212, Vila da Saúde, São Paulo, SP, 04026-002, Brasil; E-mail: anderson.santos@sp.gov.br

Feline mammary neoplasms represent the third most common type of tumor in cats and frequently result in aggressive biological behavior, evidencing malignancy in more than 80% of diagnoses in the cats. The cat's independent behavior contributes to a slow observation of the neoplastic growth by the tutor, corroborating for a later diagnosis. Histogenesis constitutes the main artifice in the classification of breast neoplasms. The grading methodology of mammary tumors in cats uses some histological parameters such as quantification of tubules, nuclear pleomorphism and mitosis count, presenting prognostic implications. In this study, 28 feline mammary formations were examined, involving fibroepithelial hypertrophies, adenomas and carcinomas, investigating, by the use of morphometric and histochemical methods (Masson's trichrome and picosirius), the potential contribution of karyometry and the evaluation of the extracellular matrix in understanding of these processes. There was a statistically significant difference related to the karyometry of the epithelial population in the different conditions, as well as in the pattern of collagen deposition in the tumor microenvironment at the core of the lesion, with an increase in the extracellular matrix associated with greater severity of the process. In association, the collagen disposition in bordering areas of the tumors was evaluated, presenting similar characteristics. These findings suggest the validity of using these resources as complementary methods for the differential diagnosis of mammary nodular formations in cats.

INDEX TERMS: cats, extracellular matrix, morphometry, veterinary oncology.

RESUMO.- [Cariometria e padrão de deposição colagênica contribuem no diagnóstico diferencial de tumorações mamárias em felinos domésticos (*Felis catus*).]

As neoplasias mamárias felinas representam o terceiro tipo de tumor mais comum nas gatas e frequentemente repercutem em um comportamento biológico tumoral agressivo, evidenciando malignidade em mais de 80% dos diagnósticos. O comportamento independente do gato colabora para uma observação morosa do crescimento neoplásico pelo tutor, corroborando para um diagnóstico mais tardio. A histogênese constitui o principal artifício na classificação das neoplasias mamárias. A metodologia de gradação de tumores mamários em gatas utiliza alguns parâmetros histológicos como quantificação de túbulos, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses, apresentando implicações prognósticas. Neste estudo, foram examinadas 28 formações mamárias felinas, envolvendo hipertrofias fibroepiteliais, adenomas e carcinomas, investigando-se, com o emprego de métodos morfométricos e histoquímicos (tricroômico de Masson e picosírius), a potencial contribuição da cariometria e da avaliação da matriz extracelular na compreensão desses processos. Evidenciou-se diferença estatisticamente significante relativa à cariometria da

população epitelial nas diferentes condições, assim como no padrão de deposição colagênica no microambiente tumoral no cerne da lesão, com incremento da matriz extracelular associado à maior severidade do processo. Em associação, foi avaliada a disposição colagênica em áreas fronteiriças das tumorações, apresentando características semelhantes. Tais achados sugerem a validade do emprego desses recursos como métodos complementares para o diagnóstico diferencial de formações nodulares mamárias em gatos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: felinos, matriz extracelular, morfometria, oncologia veterinária

INTRODUÇÃO

Na atualidade, o número de felinos do Brasil tem crescido gradativamente, estimando-se que essa espécie será a mais comum nos lares dos brasileiros (TOGNI et al., 2013). Com o maior esclarecimento dos tutores em relação às características comportamentais dos felinos, a restrição do acesso dos animais à rua e o incremento nas práticas de manejo, profilaxia, diagnóstico e tratamento de doenças na espécie, ocorreu um aumento da expectativa de vida dos felinos e com isso um crescimento na ocorrência de doenças associadas ao envelhecimento, com destaque para as neoplasias, em particular as de origem mamária (LITTLE, 2015).

As gatas apresentam quatro pares de mamas, que estão dispostas da região axilar até a região inguinal, sendo elas: torácica cranial, torácica caudal, abdominal cranial e abdominal caudal (RAHARISON; SAUET, 2006). Algumas fêmeas apresentam cinco pares, com acréscimo das glândulas inguinais. As mamas são glândulas sudoríparas modificadas, túbulo-alveolares exócrinas que contém um sistema ductal terminal ligando massas de epitélio secretor, envolto por tecido conjuntivo com pele modificada, além de gordura, nervos e vasos (KONIG; LIEBICH, 2016)

As lesões proliferativas mamárias em felinos podem ocorrer de forma neoplásica e não neoplásica. Os tipos mais comuns de lesões não neoplásicas que podem ocorrer na glândula mamária das gatas são cistos, fibrose, ectasia ductal, hiperplasia lobular e ductal e hipertrofia fibroadenomatosa (MISDORP et al., 1999). Já as neoplasias mamárias podem ser benignas ou malignas, sendo as benignas classificadas como papiloma ductal, adenoma simples e complexo (FIGUEIRA; JUNIOR, 2012).

A histogênese é o principal parâmetro para a classificação das neoplasias mamárias (ALESSI; SANTOS, 2017), sendo complementada por diversos atributos, como a presença de infiltração leucocitária peritumoral, áreas de necrose, desmoplasia, embolização neoplásica e invasão perineural (DAGHER et al, 2019; MILLS et al, 2014). Em associação, a graduação de tumores mamários em gatos considera características histológicas adicionais, como formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, permitindo a distinção de três graus de malignidade, relacionados ao prognóstico do paciente (MILLS et al, 2014).

Neoplasias mamárias felinas representam o terceiro tipo de tumor mais comum nos gatos e frequentemente repercutem em comportamento biológico tumoral agressivo, evidenciando malignidade em mais de 80% das amostras (GAMEIRO et al, 2021; VILLALOBOS; KAPLAN, 2018). Tal característica repercute na incidência de neoplasmas malignos na espécie, sendo as proliferações mamárias responsáveis por 17% deles

(DAGHER et al, 2019; FOALE; DEMETRIOU, 2010), atrás apenas de neoplasias da pele e de tecidos linfohematopoiéticos (TOGNI et al., 2013). Proporcionalmente, o carcinoma mamário é mais comum no gato do que em qualquer outra espécie doméstica (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Em geral, os carcinomas mamários em felinos apresentam crescimento infiltrativo e elevado potencial metastático, com sobrevida média após o diagnóstico de oito a doze meses (ROSEN et al., 2020; ADEGA et al, 2016). As neoplasias malignas das gatas têm sido empregadas como modelo para comparação com o câncer de mama em mulheres, particularmente os de pior prognóstico, triplo negativos, permitindo uma avaliação dos mecanismos de tumorigênese e instituição de novas terapias (FERREIRA et al, 2019).

Alterações na estrutura nuclear são a marca morfológica das lesões malignas. O tamanho e o formato nucleares, assim como o padrão da cromatina e o tamanho e o número dos nucléolos foram relatados como alterados no câncer de mama (PIENTA, 1991). O perfil nuclear tem sido descrito como preditor útil de diversos tipos de câncer (IKEGUCHI, 2000), sendo a morfometria nuclear das células tumorais um marcador prognóstico em muitas malignidades, aumentando a eficácia no diagnóstico devido à redução da subjetividade no diagnóstico (EYNARD, 2009).

A matriz extracelular (MEC) caracteriza-se por uma extensa rede macromolecular altamente dinâmica, promotora de interações bioquímicas e biomecânicas presente em todos os tecidos, constituída por água, colágenos, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, laminina e diversas outras glicoproteínas. Os componentes da MEC ligam-se entre si e aos receptores de adesão celular formando uma rede complexa em meio à qual as células se distribuem (BONNANS, 2014; PICKUP, 2014; THEOCHARI, 2016). Diversos processos como proliferação, migração e diferenciação celulares são afetados pelos componentes da MEC (KARAMANOS, 2021). O complexo processo de tumorigênese envolve interações dinâmicas entre as células malignas e o estroma à sua volta, incluindo ambos os componentes, celulares e não celulares (ALKASALIAS, 2018), influenciando em particular na motilidade e disseminação tumorais (KAUSHIK, 2018; POLTAVETS, 2018). Evidências crescentes sugerem que proteínas da MEC executam um papel funcional na progressão e metástase do câncer de mama (INSUA-RODRÍGUEZ, 2016).

Na medida em que o diagnóstico precoce com caracterização histológica adequada e o tratamento intenso contribuem para maior sobrevida dos gatos acometidos por câncer de mama, objetivou-se neste estudo avaliar a contribuição de mensurações cariométricas e da MEC tumoral no diagnóstico e prognóstico de tumorações mamárias felinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo visando a análise de tumorações mamárias em felinos, envolvendo amostras de hipertrofia fibroepitelial e de neoplasias benignas e malignas provenientes dos arquivos do laboratório Rous Patologia Animal. As amostras obtidas foram provenientes de procedimentos cirúrgicos realizados para fins de diagnóstico sendo oriundas de variadas clínicas e hospitais veterinários.

O critério de inclusão adotado na escolha das amostras foi o diagnóstico de formação nodular mamária, maligna ou benigna, em gatos.

Amostras

Foram utilizadas 28 amostras de tumorações mamárias felinas, provenientes de animais atendidos em clínicas e hospitais veterinários da Grande São Paulo, diagnosticadas e arquivadas no laboratório Rous Patologia Animal.

Avaliação histológica

Os tecidos mamários felinos, previamente fixados em solução de formol a 10%, passaram por processamento histológico convencional e cortes de aproximadamente 5mm e foram posteriormente corados pela hematoxilina-eosina. As amostras foram diagnosticadas e graduadas seguindo-se as diretrizes da Organização Mundial de Saúde e do protocolo proposto por Mills et al, 2014.

A Mensuração volumétrica tumoral, dada em cm^3 com utilização de paquímetro, foi realizada mediante a verificação do produto das medidas de comprimento x profundidade x espessura x 0,5, conforme proposto por Weirich et al., 2001.

Avaliação histoquímica

Foram utilizadas duas técnicas de coloração para o estudo da composição da matriz extracelular tumoral: o tricrômico de Masson, corando as fibras colágenas em azul, e o picrossirius, corando as fibras colágenas em vermelho, exibindo refringência mediante a análise sob luz polarizada, sendo particularmente útil para a verificação da espessura, distribuição e quantidade de fibras. Foram consideradas para a avaliação o cerne da neoplasia e os sítios fronteiros de crescimento tumoral.

Avaliação morfométrica. Cariometria

Amostras foram submetidas à avaliação morfométrica com o emprego do software ImageJ® com dois propósitos. O primeiro se relaciona à determinação de características cariométricas das células epiteliais, em particular a área e o perímetro nucleares. Para tanto, a partir de cada amostra corada pela hematoxilina-eosina foram obtidas duas imagens digitalizadas, em áreas de maior atipia celular, capturadas pelo fotomicroscópio NIKON E 200 - Coolpix®. Com o auxílio do cursor, os núcleos das células epiteliais das lesões foram individualmente demarcados, permitindo a obtenção de sua área e perímetro, totalizando 100 células mensuradas por lesão.

Avaliação morfométrica. Deposição colagênica

Analogamente, com o emprego do fotomicroscópio NIKON E 200 - Coolpix®, foi capturada uma imagem digitalizada por lesão tumoral mamária, a partir de cortes histológicos corados pelo picosirius e observados sob luz polarizada com a objetiva de 40x. O alvo nesse procedimento, segundo propósito da avaliação morfométrica, foi o centro da lesão tumoral, visando-se a quantificação do colágeno local. A mensuração do colágeno foi realizada a partir da consideração das áreas refringentes na área representada, expressa como percentual do campo amostrado.

Análise estatística

Os dados morfométricos foram apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças das médias dos resultados obtidos foram comparadas pela análise de variância (ANOVA). A probabilidade de $p < 0,05$ foi considerada como estatisticamente significativa.

RESULTADOS

Características gerais da amostragem. Raça, gênero, faixa etária

Houve o amplo predomínio de amostras provenientes de felinos sem raça definida (19/28), seguidos pelos animais referidos como siameses (4/28) e persas (3/28), sendo que em dois animais não houve informação relativa a esse parâmetro. Dos 28 animais amostrados, 27 eram fêmeas (tabela 1). A faixa etária apresentou ampla variação se comparados os animais com hipertrofia em relação aos dotados de lesões neoplásicas. Nas gatas com hipertrofia mamária, a idade variou de 0,67 a dois anos. A maior media etária coube às gatas portadoras de carcinomas de grau II de malignidade (figura 1).

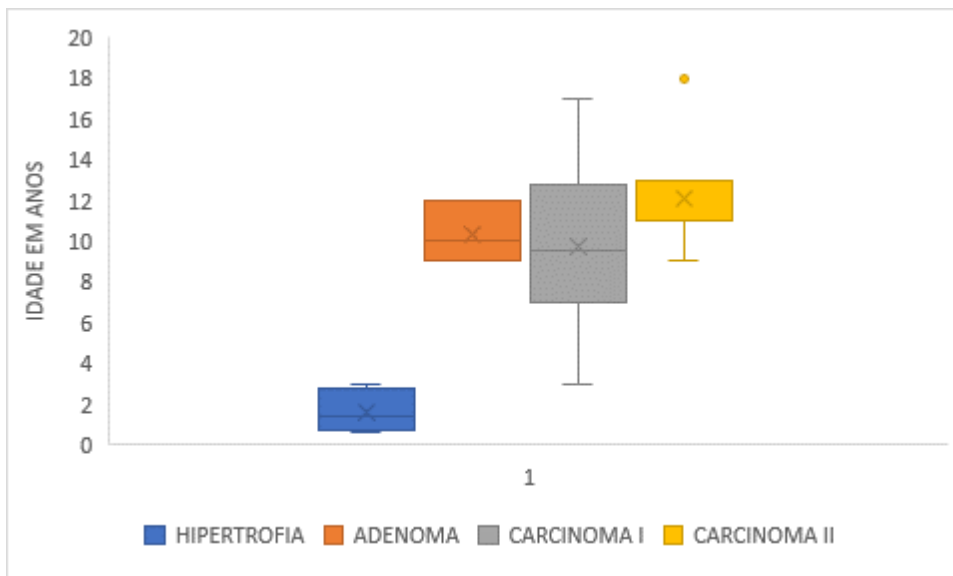


Figura 1: Faixa etária média dos felinos diagnosticados com lesões hipertróficas, adenomatosas e carcinomatosas em mamas.

Avaliação anatomo-patológica das lesões

O volume lesional apresentou grande variação, com valor mínimo mensurado de $0,02\text{cm}^3$ e máximo de 440cm^3 , dos quais as médias obtidas foram de $121,47\text{ cm}^3$ nas hipertrofias, $0,65\text{ cm}^3$ nos adenomas, $0,73\text{cm}^3$ nos carcinomas de grau I e $3,952\text{ cm}^3$ nos carcinomas de grau II (quadro 1, tabela 1).

Tabela 1: Volume lesional em amostras de hipertrofia fibroepitelial, adenoma e carcinoma de mama de gatos. ANOVA.

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Hipertrofia	5	607,3624	121,4725	33485,58
Adenoma	5	3,27	0,654	0,18273
Carcinoma I	8	5,84	0,73	1,221771
Carcinoma II	10	39,52	3,952	17,663

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	58571,62	3	19523,87	3,49393	0,031074	3,008787
Dentro dos grupos	134110,6	24	5587,94			
Total	192682,2	27				

Quadro 1. Relação das amostras mamárias estudadas, considerando a raça, gênero, idade em anos, volume lesional, diagnóstico histopatológico, área e perímetro nucleares.

AMOSTRA	RAÇA	GÊNERO	IDADE (A)	DIAGNÓSTICO	GRAU	ÁREA DO NÚCLEO (μm^2)	PERÍMETRO DO NÚCLEO (μm)	VOLUME LESIONAL (cm^3)
H209082102	SRD	F	-	hipertrofia	-	18,089	17,404	14,62
H209092203A	SRD	F	0,67	hipertrofia	-	23,839	18,904	110
H214092201	SRD	F	0,84	hipertrofia	-	16,514	15,833	440
H211092002A	SRD	F	3	hipertrofia	-	13,895	14,596	42,5
H223082202	SRD	F	2	hipertrofia	-	17,51	15,29	0,24
H225032205	SRD	F	10	adenoma	-	20,116	18,278	0,73
H206041701	SRD	F	-	adenoma	-	16,333	14,958	0,06
H221012201	SRD	M	-	adenoma	-	13,187	13,461	1,11
H204032203	SRD	F	9	adenoma	-	16,152	14,834	0,4
H201062001	SRD	F	12	adenoma	-	19,086	16,27	0,97
H225112101	siamês	F	9	carcinoma	I	15,954	15,863	0,11
H229122101	SRD	F	10	carcinoma	I	25,168	20,192	0,15
H213062202A	SRD	F	7	carcinoma	I	18,005	17,968	0,82
H202052202A	SRD	F	12	carcinoma	I	16,516	15,925	3,11
H228092101	siamês	F	17	carcinoma	I	14,717	14,549	1,56
H206042201	persa	F	13	carcinoma	I	21,579	17,551	0,03
H225072201	SRD	F	7	carcinoma	I	13,521	13,775	0,02
H212042201	persa	F	3	carcinoma	I	16,521	14,927	0,04
H215092202	siamês	F	9	carcinoma	II	42,226	26,505	7,41
H220092101	SRD	F	13	carcinoma	II	26,341	20,836	0,41
H208112103	SRD	F	11	carcinoma	II	33,347	24,027	0,82
H205082202	-	F	-	carcinoma	II	23,308	19,27	2,84
H220072201	SRD	F	11	carcinoma	II	26,129	20,963	2,63
H214042102	-	F	11	carcinoma	II	26,854	20,413	6,71
H228052105	persa	F	11	carcinoma	II	28,532	19,957	2,9
H206092201	siamês	F	18	carcinoma	II	20,512	17,436	13,72
H205092202	SRD	F	-	carcinoma	II	20,073	17,439	1,58
H202092201A	SRD	F	13	carcinoma	II	27,366	20,022	0,5

Amostras tumorais mamárias, provenientes de vinte e sete gatas e um gato, foram diagnosticadas histopatologicamente como casos de hipertrofia fibroepitelial, adenoma e carcinoma mamários.

O diagnóstico de hipertrofia fibroadenomatosa mamária, correspondeu a 17,85% (5/28) das amostras, caracterizadas pela expansão de estruturas ductais mamárias, delimitadas por células epiteliais homogêneas, constituindo camadas duplas ou triplas, dispostas sobre um estroma frouxo (figura 2A).

Na mesma proporção, foram diagnosticados adenomas mamários, também compreendendo 17,85% (5/28) dos casos. Nestes, foi identificada expansão do epitélio tubular, caracterizando uma hiperplasia tecidual, com população epitelial discretamente pleomórfica (figura 2B).

Os demais dezoito animais apresentaram lesões carcinomatosas mamárias, sendo 28,58% (8/28) carcinomas de grau I e 35,70% (10/28) carcinomas de grau II de malignidade. As características mais marcantes nessas lesões são o aumento do pleomorfismo, com importante aumento da relação núcleo/citoplasma, anisocariose, macronúcleolos e incremento mitótico com atipias. Presença de áreas de estratificação epitelial e focos de invasão do estroma adjacente (figuras 2C/D).

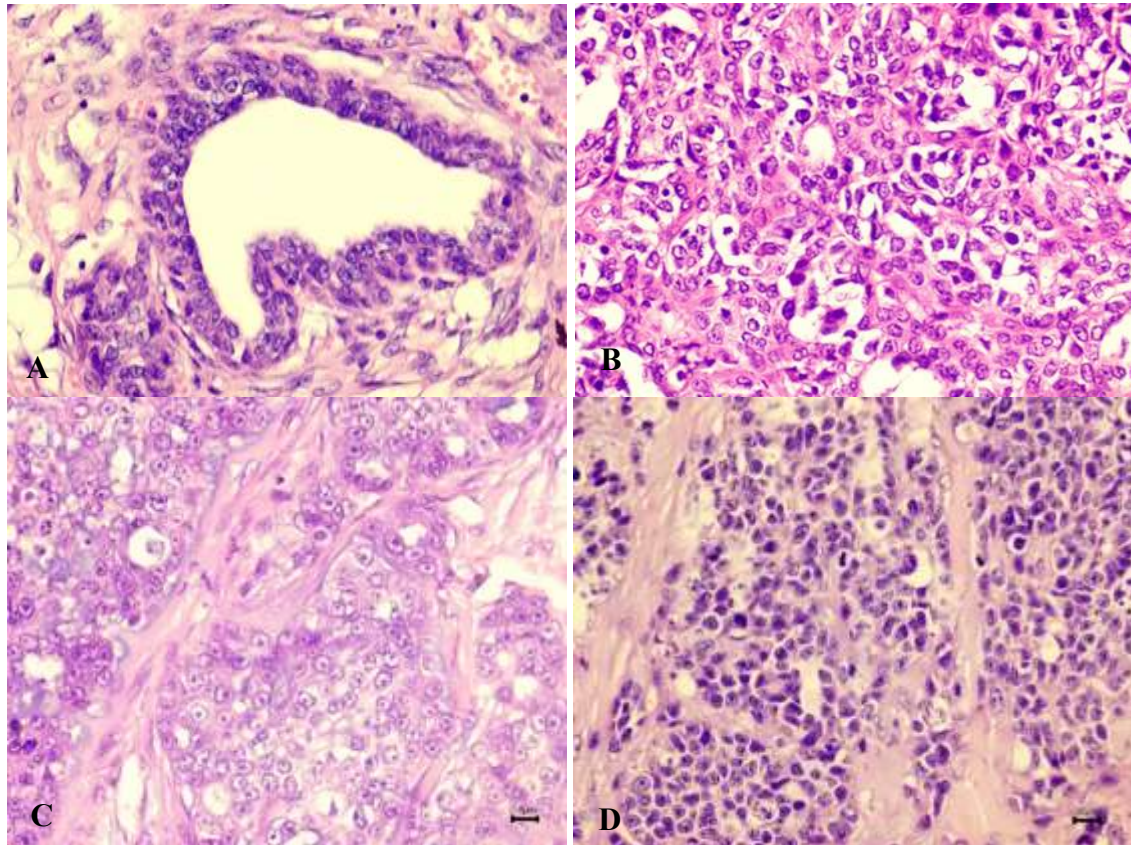


Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos exibindo amostras de hipertrofia fibroepitelial, adenoma e carcinoma mamários.

A. Fotomicrografia de corte histológico de hipertrofia fibroepitelial mamária evidenciando estrutura ductal mamária, delimitada por camada dupla ou tripla de epitélio cúbico (hematoxilina-eosina)

B. Fotomicrografia de corte histológico de adenoma mamário, apresentando maior densidade celular, com estruturas tubulares delimitadas por epitélio com discreto pleomorfismo (hematoxilina-eosina)

C. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma mamário, exibindo expansão de população epitelial, organizando túbulos, com áreas de estratificação parietal e invasão estromal. Pleomorfismo moderado (hematoxilina-eosina)

D. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma mamário, apresentando o predomínio de áreas sólidas. Incremento mitótico (hematoxilina-eosina)

Avaliação morfométrica. Cariometria

A análise cariométrica foi executada com auxílio do método estatístico não paramétrico de ANOVA, cujos resultados podem ser visualizados nas figuras 3, 4 e 5.

O teste de variância ANOVA evidenciou na mensuração nuclear que há uma maior área e perímetro em carcinomas II no qual há diferença estatisticamente significativa nas distribuições dos grupos diagnosticados com hipertrofia, adenoma, carcinoma de grau I e carcinoma de grau II: área ($F_{crit} = 3,00$; $F_{cal} = 8,93$ | $p < 0,01$); perímetro ($F_{crit} = 3,00$; $F_{cal} = 8,59$ | $p < 0,01$), conforme a figura 3.

Comparando-se os grupos hipertrofia e adenoma x carcinomas I e II, evidencia-se maior área nuclear e perimetral nos carcinomas I e II, nos quais há diferença estatisticamente significativa: área ($F_{crit} = 4,22$; $F_{cal} = 5,46$ | $p < 0,05$); perímetro ($F_{crit} = 4,22$; $F_{cal} = 6,08$ | $p < 0,05$), conforme a figura 4.

A análise comparativa dos dados do carcinoma grau II com a somatória dos dados dos demais grupos destaca uma maior área nuclear e perimetral nos carcinomas II, nos quais há diferença estatisticamente significativa: área ($F_{crit} = 4,22$; $F_{cal} = 28,77$ | $p < 0,01$); perímetro ($F_{crit} = 4,22$; $F_{cal} = 26,94$ | $p < 0,01$).

A investigação comparativa entre as mensurações nucleares das neoplasias malignas submetidas ao estudo, carcinoma de grau I x carcinoma de grau II, destaca uma maior área nuclear e perimetral nos carcinomas II, nos quais há diferença estatística significativa: área ($F_{crit} = 4,49$; $F_{cal} = 13,98$ | $p < 0,01$); perímetro ($F_{crit} = 4,49$; $F_{cal} = 13,35$ | $p < 0,01$), conforme a figura 5.

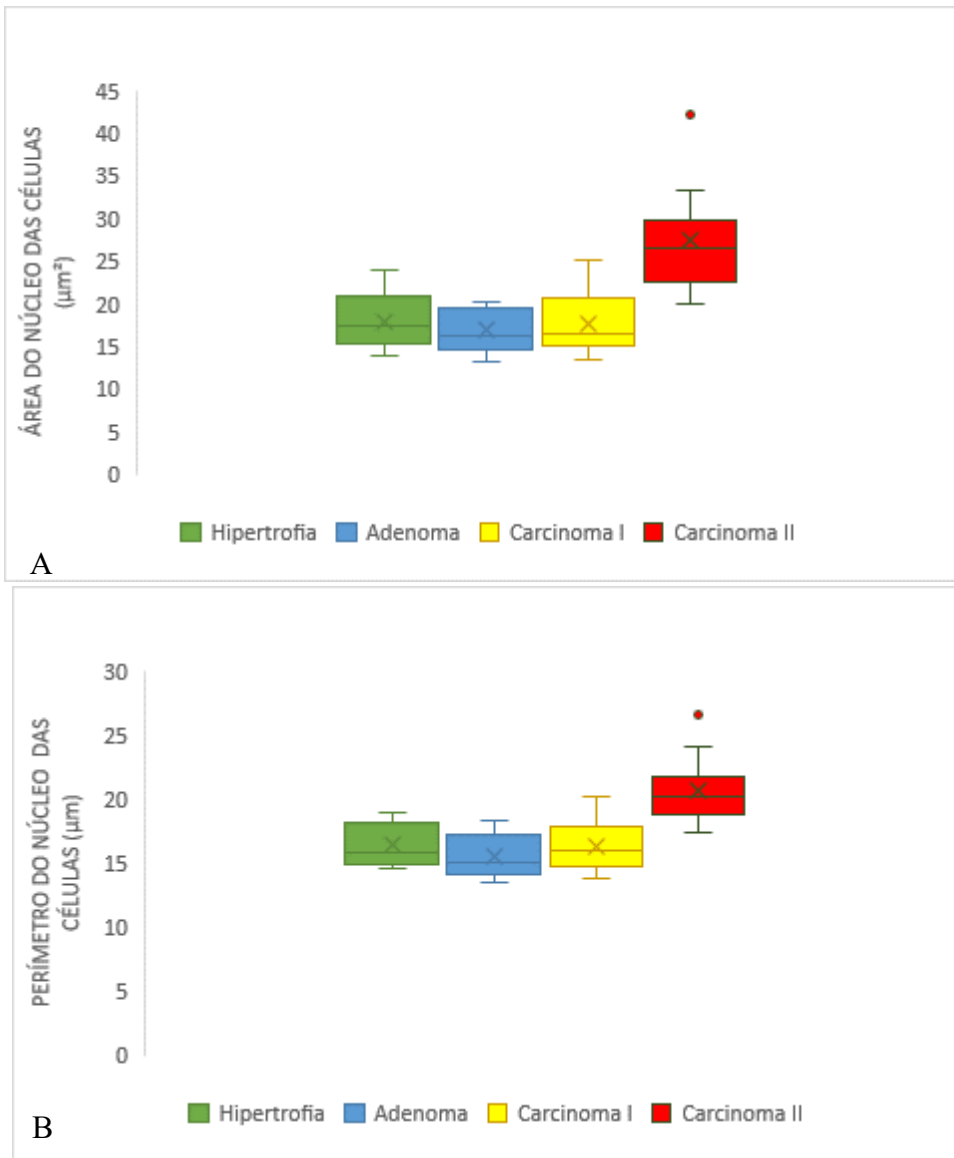


Figura 3. Avaliação morfométrica por ImageJ® do núcleo de 100 células por lesão para avaliação de área (μm^2) e perímetro (μm) nucleares obtidas por imagens digitalizadas, em áreas de maior atipia celular, capturadas pelo fotomicroscópio NIKON E-200 – Coolpix®. Gráficos da relação entre área e volume do núcleo das células de diferentes amostras analisadas.

A. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação da área do núcleo das células entre hipertrofia x adenoma x carcinomas grau I x carcinoma de grau II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 3,00$; $F_{\text{cal}} = 8,93$ | $p < 0,01$).

B. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação de perímetro do núcleo das células entre hipertrofia x adenoma x carcinoma de grau I x carcinoma de grau II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 3,00$; $F_{\text{cal}} = 8,59$ | $p < 0,01$).

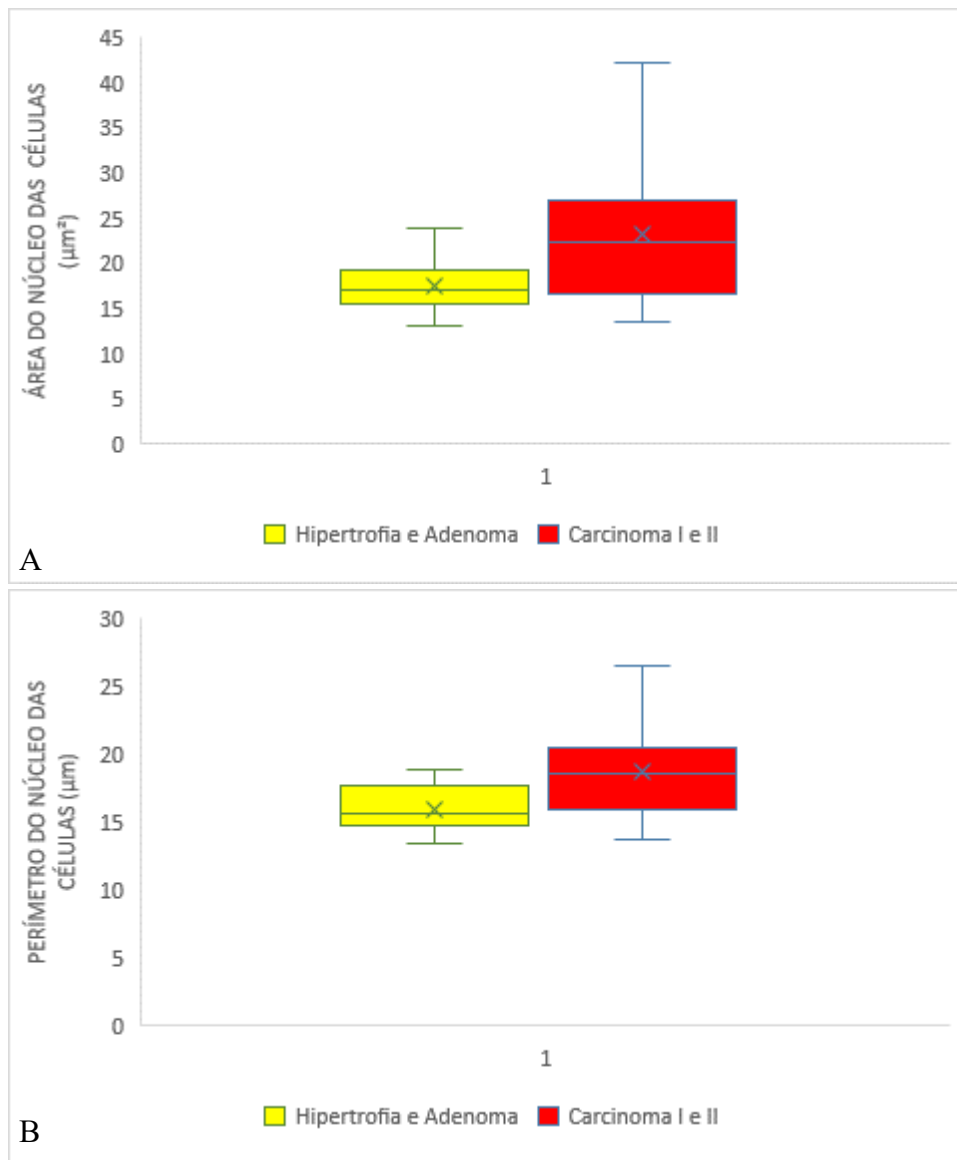


Figura 4. Avaliação morfométrica por ImageJ® do núcleo de 100 células por lesão para avaliação de área (μm^2) e perímetro (μm) nucleares obtidas por imagens digitalizadas, em áreas de maior atipia celular, capturadas pelo fotomicroscópio NIKON E-200 – Coolpix®. Gráficos da relação entre área e volume do núcleo das células de diferentes amostras analisadas.

A. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação de área do núcleo das células entre hipertrofia e adenoma x carcinomas grau I e II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 4,22$; $F_{\text{cal}} = 5,46$ | $p < 0,05$).

B. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação de perímetro do núcleo das células entre hipertrofia x adenoma x carcinoma de grau I x carcinoma de grau II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 4,22$; $F_{\text{cal}} = 6,08$ | $p < 0,05$).

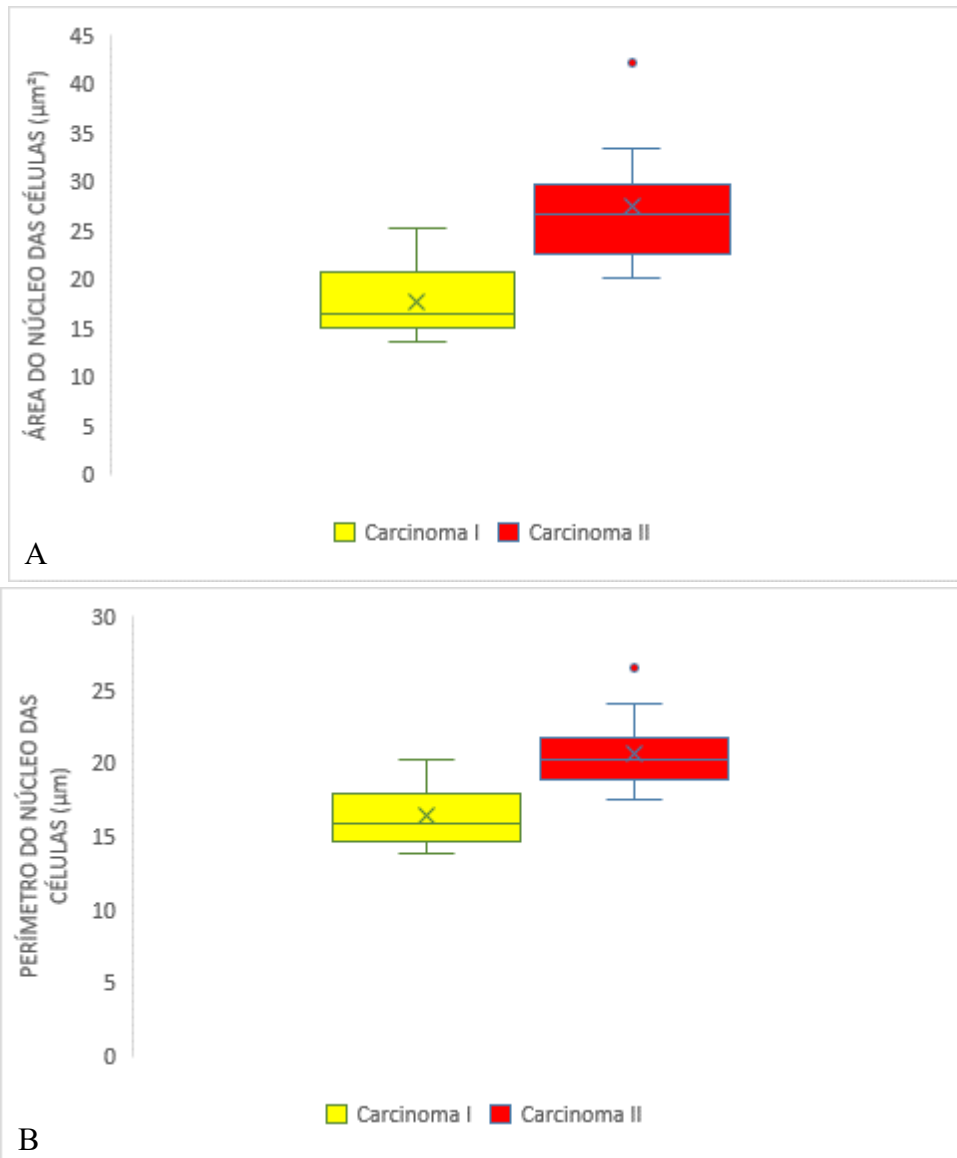


Figura 5. Avaliação morfométrica por ImageJ® do núcleo de 100 células por lesão para avaliação de área (μm^2) e perímetro (μm) nucleares obtidas por imagens digitalizadas, em áreas de maior atipia celular, capturadas pelo fotomicroscópio NIKON E-200 – Coolpix®. Gráficos da relação entre área e volume do núcleo das células de diferentes amostras analisadas.

A. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação de área do núcleo das células do carcinoma de grau I x carcinoma de grau II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 4,49$; $F_{\text{cal}} = 13,98$ | $p < 0,01$).

B. Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação do perímetro do núcleo das células do carcinoma de grau I x carcinoma de grau II com evidência de diferença estatística significativa ($F_{\text{crit}} = 4,49$; $F_{\text{cal}} = 13,35$ | $p < 0,01$).

Avaliação histoquímica por tricrômico de Masson

Os resultados obtidos para análise de matriz extracelular com tricrômico de Masson com vistas à identificação e avaliação de fibras colágenas evidencia diferentes graus de densidade colagênica nas amostras de hipertrofia, exibindo agregados colagênicos discretos; adenoma, exibindo fibras colagênicas circundando estruturas tubulares e carcinomas mamários com múltiplos depósitos colagênicos, conforme a figura 6:

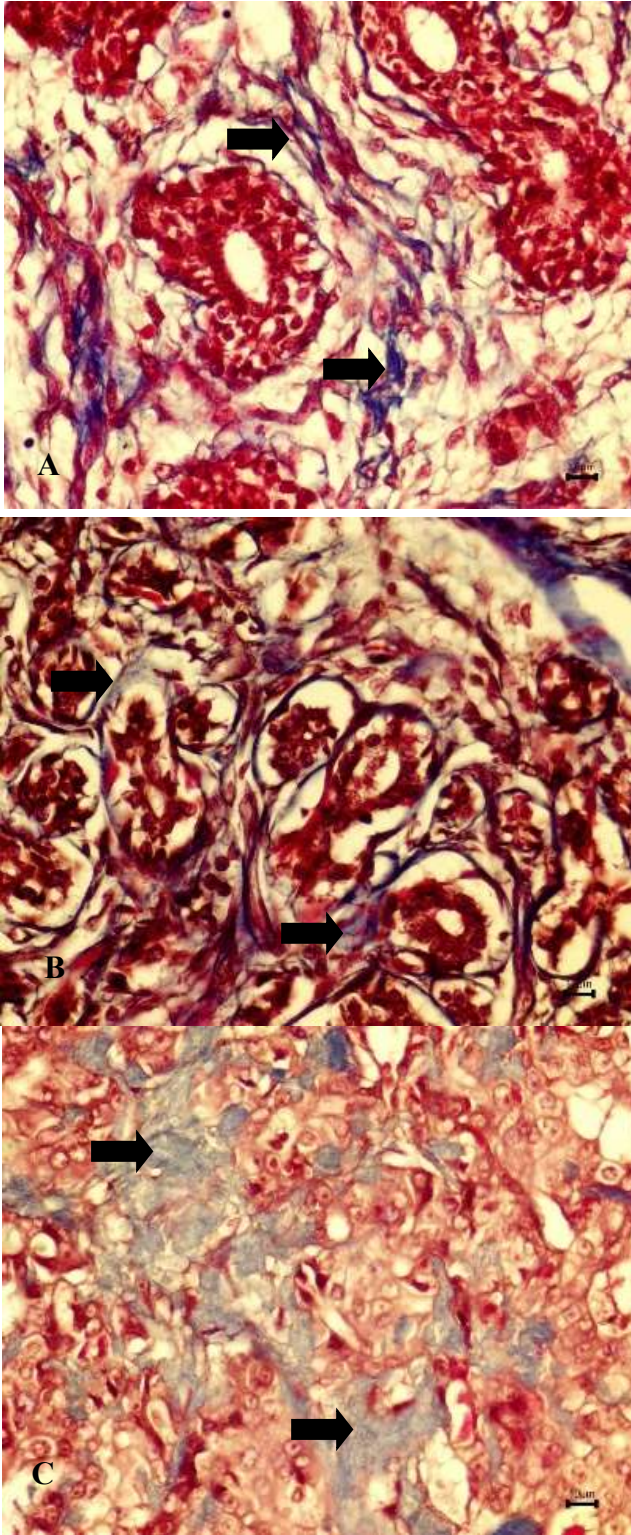


Figura 6. Fotomicrografias de cortes histológicos corados com tricrômico de Masson.
A. Fotomicrografia de corte histológico de hipertrofia fibroepitelial mamária, evidenciando estroma frouxo com discretos agregados colagênicos intersticiais (tricrômico de Masson, setas).
B. Fotomicrografia de corte histológico de adenoma mamário, apresentando maior densidade celular, com estruturas tubulares delimitadas por estroma colagênico (tricrômico de Masson, setas).
C. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma mamário, exibindo incremento colagênico, com múltiplos depósitos intersticiais, assumindo aspecto grumoso (tricrômico de Masson, setas).

Avaliação histoquímica por picrosirius sob luz polarizada

Os resultados obtidos para análise da disposição das fibras colagênicas com uso de picrosirius sob luz polarizada evidencia diferentes graus de deposição colagênica intratumoral e peritumoral nas amostras de hipertrofia, adenoma e carcinoma mamários, com evidência de maior deposição de colágeno nos processos carcinomatosos, conforme as figuras 7 e 9.

Em associação, particularmente para o centro da lesão tumoral, foi procedida avaliação morfométrica, quantificando-se o percentual do campo ocupado por fibras colágenas, corroborando os achados histológicos, mostrando progressivo incremento na deposição de colágeno com a progressão da severidade da condição, conforme a tabela 2 e a figura 8.

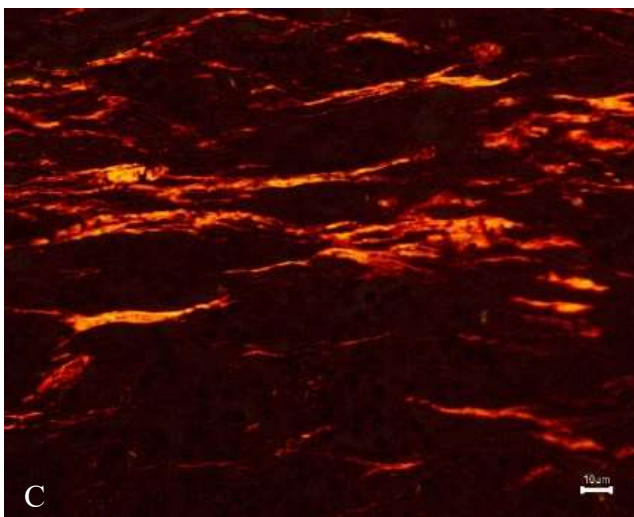
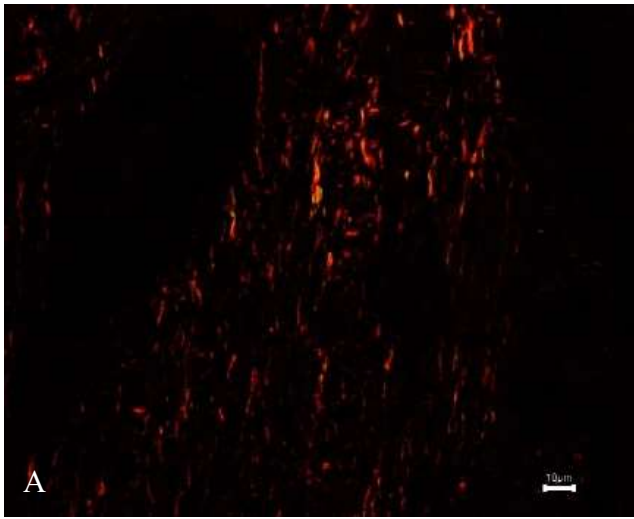


Figura 7. Fotomicrografias de tecido mamário felino evidenciam o padrão de deposição de fibras colágenas em meio à lesão na hipertrofia (A), ao adenoma (B) e carcinoma mamários (C). Picosirius sob luz polarizada, com intensificação no processo carcinomatoso.

Tabela 2: Expressão percentual da marcação histoquímica de picrosírius em amostras de afecções benignas (hipertrofia fibroepitelial e adenoma) x afecções malignas (carcinoma de mama de gatos). ANOVA.

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Benigno	10	10,6	1,06	0,693822
Maligno	18	99,26	5,514444	3,528979

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	127,5562	1	127,5562	50,06958	0,0000001	4,225201
Dentro dos grupos	66,23704	26	2,547579			
Total	193,7932	27				

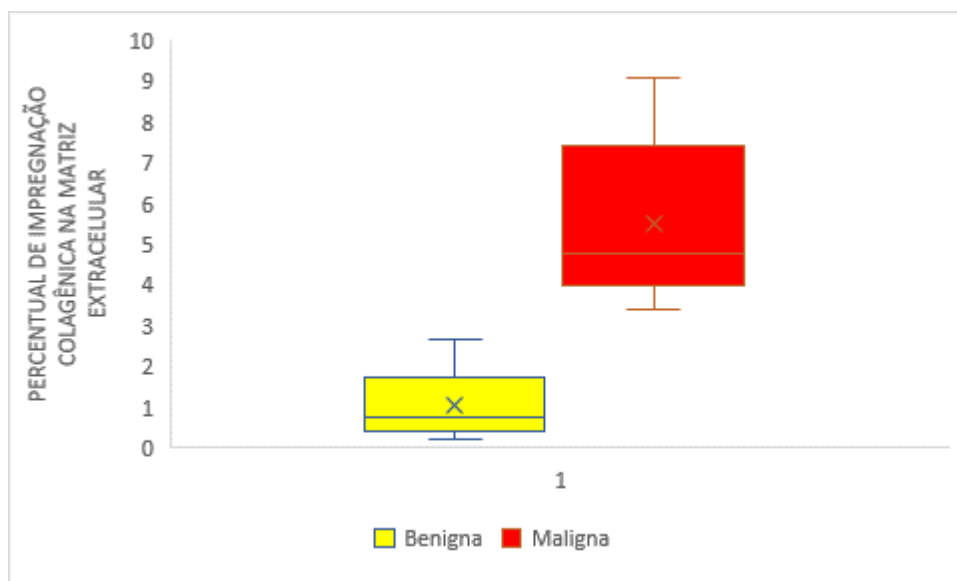


Figura 8. Deposição colagênica no microambiente tumoral: Gráfico Box-Plot representando os achados estatísticos da relação da deposição colagênica no microambiente tumoral mediante o percentual de marcação histoquímica de picrosírius das afecções benignas x malignas com evidência de diferença estatisticamente significativa ($F_{crit} = 4,22$; $F_{cal} = 50,06$ | $p < 0,01$).

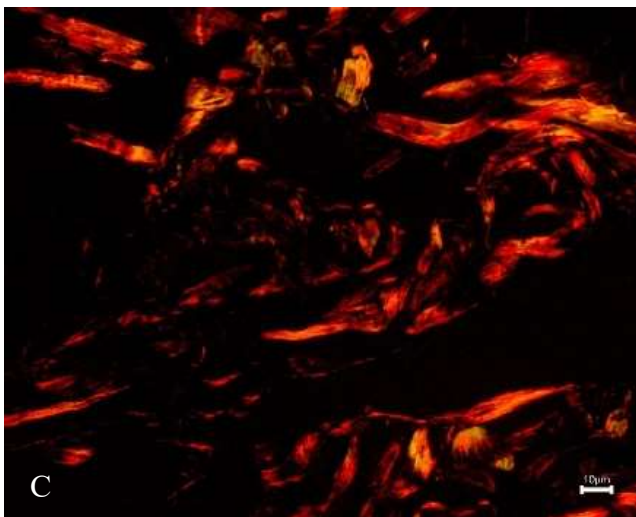
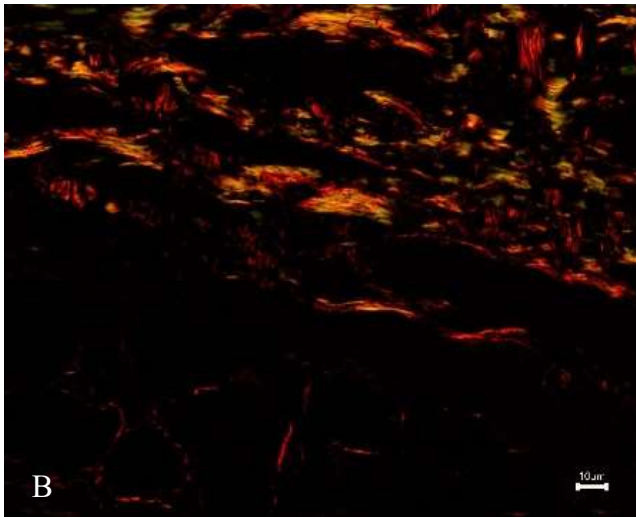
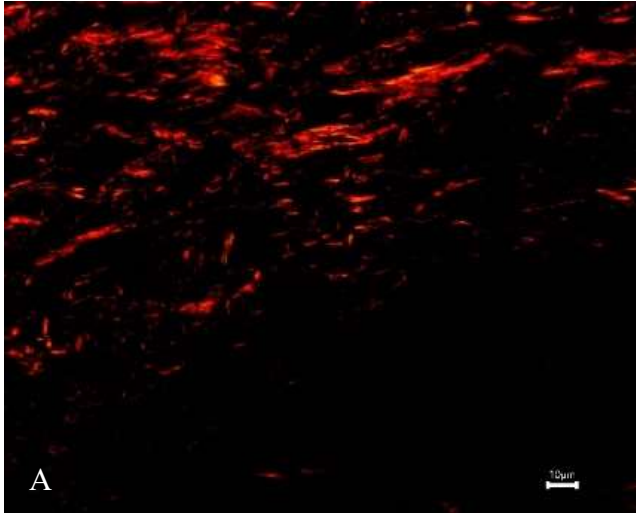


Figura 9. Fotomicrografias de tecido mamário felino evidenciam o padrão de deposição de fibras colágenas na periferia lesional em caso de hipertrofia (A), adenoma (B) e carcinoma mamários (C), com progressivo aumento na deposição, da hipertrofia ao carcinoma. Picrosirius sob luz polarizada.

DISCUSSÃO

O câncer de mama representa uma causa importante de morbidade e mortalidade, em particular em humanos e animais de companhia (ROSEN et al, 2020), justificando esforços no sentido de aperfeiçoar a obtenção de informações diagnósticas e prognósticas. Embora menos frequente que as neoplasias mamárias caninas, as lesões felinas são biologicamente mais agressivas e reproduzem com maior proximidade as características microscópicas observadas nas lesões humanas do que as lesões mamárias caninas e murinas, em especial em relação aos carcinomas mamários referidos como triplo negativos, funcionando como um modelo relevante em patologia comparada (GARDEN et al, 2018).

Os tumores podem apresentar diferentes tamanhos, assim como podem ser fixos ou móveis, firmes ou císticos, e ulcerados (LITTLE, 2015). Dessa forma, de acordo com a literatura, os tumores com menores dimensões estão associados com uma maior sobrevivência do animal. Nas lesões que exibem crescimento superior a três centímetros há pior prognóstico e maior risco de metástase (VILALOBOS; KAPLAN, 2018). Também, tumores ulcerados estão relacionados a um estágio mais avançado da doença (OLIVEIRA, 2019). Esses dados, relacionando dimensões e agressividade, estão em consonância com a variação volumétrica observada nas amostras avaliadas neste estudo, que apresentaram menores dimensões em adenomas e progressão de volume com o avanço na graduação dos carcinomas. Merece destaque, no entanto, a profusa expansão tecidual relacionada às condições hipertróficas mamárias, vinculadas à uma modulação endócrina (MISDORP, 1999).

Em termos histológicos, as lesões malignas mamárias felinas são predominantemente expansões túbulo-papilíferas e sólidas, à semelhança do observado em nossa amostragem, guardando maior analogia com o padrão glandular predominante nas lesões mamárias humanas. Já nas amostras caninas, a proporção de malignidade é inferior, correspondendo aproximadamente a 45% das formações, sendo que nessas existe um importante contingente de lesões complexas e mistas, apresentando, respectivamente, expressivo componente mioepitelial e metaplásico (ADEGA et al, 2016). Nossa amostragem envolveu 28 formações mamárias, sendo cinco adenomas, um deles em um macho. Embora as neoplasias mamárias sejam mais frequentes em fêmeas, há um pequeno contingente de machos afetados, segundo Gundim, 2017, correspondendo a cerca de 2% das neoplasias mamárias diagnosticadas na espécie felina.

A proposta deste estudo foi a de contribuir para a compreensão da biologia e do diagnóstico de tumorações mamárias felinas, com o emprego de técnicas potencialmente

aplicáveis a amostras na rotina do laboratório de anatomia patológica. Nesse sentido, optou-se pelo emprego da avaliação morfométrica e histoquímica, considerando, em particular, os avanços relacionados à participação do estroma no desenvolvimento neoplásico e sua relação com o prognóstico dos pacientes oncológicos, em especial, aos portadores de neoplasias mamárias.

Em nosso estudo, evidenciou-se diferença estatisticamente significativa em relação a parâmetros cariométricos entre as lesões benignas e malignas, em consonância com o observado em urotélio reacional e carcinomatoso em humanos (POROPATICH et al., 2016) e aos achados de Strefezzi et al., 2003, que demonstraram distinções cariométricas em paralelo à agressividade biológica em mastocitomas cutâneos caninos. Nossos achados, à semelhança de estudos anteriores em lesões mamárias benignas e malignas em mulheres e gatas (MOMMERS et al, 2001; DE VICO et al, 1997), sugerem a adequação da análise cariométrica na interpretação de amostras de neoplasias mamárias felinas, com potencial extensão para análises citológicas, frequentemente utilizadas como método de triagem diagnóstica em formações mamárias de gatos. De maneira geral, o aumento nas dimensões nucleares está relacionado a modificações arquiteturais nucleares, envolvendo a reorganização dos genes, dos transcritos e dos complexos regulatórios locais. Em termos moleculares, mutações pontuais e translocações resultam no rearranjo de elementos promotores e de sequências codificantes, resultando em ativação e supressão de genes, dependentemente do contexto microambiental nuclear (ZAIDI et al, 2007).

Hanahan & Weinberg, 2011, destacam a importância das interações entre as células neoplásicas e o estroma para o estabelecimento do prognóstico do paciente, fundando um novo paradigma na área oncológica. O microambiente tumoral é uma entidade dinâmica e heterogênea, composto por células neoplásicas e não neoplásicas, envolvendo componentes estromais e imunes (NASCIMENTO; FERREIRA, 2021), além de moléculas sinalizadoras e da matriz extracelular, em particular de seu componente colagênico. Vários estudos têm evidenciado que tanto a quantidade quanto a qualidade das fibras colágenas são capazes de interferir no devir do paciente oncológico, regulando o crescimento e a invasão neoplásicas (LEVANTAL et al., 2009; CONKLIN et al., 2011). Esse fenômeno foi caracterizado por Daniel et al, 2019, em mastocitomas cutâneos caninos, mostrando uma relação inversa entre deposição colagênica e tempo de sobrevida e mortalidade em cães. O mesmo não foi encontrado em lesões melanocíticas orais caninas, ressaltando a necessidade de considerar cada histogênese oncológica como uma entidade dotada de especificidades (LEITE et al, 2021). Recentemente, Case et al., 2017, e Rosen et al., 2020, evidenciaram, com o emprego de métodos sofisticados, como a microscopia confocal, a relação entre agressividade tumoral e deposição colagênica, mostrando que

maior densidade, espessura e comprimento de fibras estão associados a um pior prognóstico, respectivamente, em carcinomas mamários de cadelas e gatas.

Nossos achados vão ao encontro das observações de Rose et al, 2020, porém com o emprego de metodologia de fácil aplicação na rotina laboratorial, limitada ao emprego de método histoquímico e observação sob luz polarizada. Assim, houve maior deposição colagênica como um todo nas lesões malignas. Nesse sentido, é importante considerar que a deposição colagênica foi avaliada em dois microambientes teciduais: a intimidade da lesão e suas fronteiras com o tecido adjacente. Na primeira condição, além da avaliação histopatológica dos cortes, foi procedida avaliação morfológica, que corroborou os achados morfológicos. Nas áreas de fronteira, devido às dimensões reduzidas e à eventual ausência de representação de uma área limítrofe com o tecido preservado, foi procedida apenas a caracterização morfológica. Essa abordagem de fronteira tem como base a hipótese de que nos sítios limítrofes de crescimento tumoral coexistem as subpopulações neoplásicas mais agressivas, com elevado potencial de invasão e disseminação (PIFFKÖ et al., 1997). Essa compreensão é corroborada com o emprego de protocolos de graduação direcionados para as áreas de fronteira do crescimento tumoral, como o de BRYNE et al, 1992, trabalhando com carcinomas espinocelulares de boca, mostrando relação com a taxa de recorrência e o tempo de sobrevida dos pacientes. Em consonância com esses achados, pode-se identificar nas lesões felinas um padrão de deposição colagênica distinta no cerne da lesão neoplásica e nestes territórios fronteiricos, quando comparados quadros hiperplásicos, adenomatosos e carcinomatosos, com maior quantidade e aleatoriedade na deposição de fibras nas lesões malignas.

A partir do entendimento da biologia tumoral e seu desenvolvimento como um processo heterotípico que envolve a dupla via entre parênquima e estroma, acarretando modificações fisiopatológicas recíprocas, a distinção na conformação colagênica, estromal, nos carcinomas pode ser tanto causa como efeito de uma progressão tumoral alterada (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

CONCLUSÃO

Os achados cariométricos e o padrão de deposição colagênica no microambiente tumoral evidenciaram diferenças relevantes entre hipertrofia fibroepitelial, adenoma e carcinoma mamário felino, favorecendo o emprego desses parâmetros como procedimentos diagnósticos nessas condições de modo a possibilitar a redução da subjetividade diagnóstica.

A metodologia consiste em aplicação simples e de baixo custo para a rotina diagnóstica. Nesse sentido, a técnica se mostrou viável para aplicação em rotina laboratorial como ferramenta de contribuição no diagnóstico diferencial de tumorações mamárias em gatos domésticos.

Declaração de conflito de interesses. - Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- ADEGA, F.; BORGES, A.; CHAVES, R. Cat Mammary Tumors: Genetic Models for the Human Counterpart. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 3, p. 17, 16 ago. 2016.
- ALKASALIAS, T. et al. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1532, 21 maio 2018.
- ANDREA, C. E. DE; BLEGGI-TORRES, L. F.; ALVES, M. T. DE S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, p. 51-57, 1 fev. 2008.
- ANTUNES, S.C.S. ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA FELINE MAMMARY TUMOURS: A LITERATURE REVIEW. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/16788/1/Disserta%C3%A7ao_Sandra%20Antunes.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2023.
- BIRCH, H. L. Extracellular Matrix and Ageing. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 90, p. 169-190, 2018.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 21 nov. 2014.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375-381, abr. 1992.
- CASE, A. et al. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180448, 6 jul. 2017.
- CONKLIN, M. W. et al. Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1221-1232, mar. 2011.
- COSTA, M. M. Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de tumores mamários na cadela e na gata. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- DANIEL, J. et al. Intratumoral collagen index predicts mortality and survival in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 162-e48, 28 jan. 2019.
- DAGHER, E. et al. Feline Invasive Mammary Carcinomas: Prognostic Value of Histological Grading. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 5, p. 660-670, 21 maio 2019.
- DE CAMPOS, C. B. et al. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 12, p. 1003-1012, 1 dez. 2016.
- DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Prognostic value of nuclear morphometry in feline mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 2, p. 99-105, 1 ago. 1997.
- DUMITRESCU, R. G. Interplay Between Genetic and Epigenetic Changes in Breast Cancer Subtypes. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1856, p. 19-34, 2018.

DZOBO, K.; DANDARA, C. Architecture of Cancer-Associated Fibroblasts in Tumor Microenvironment: Mapping Their Origins, Heterogeneity, and Role in Cancer Therapy Resistance. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 24, n. 6, p. 314-339, 1 jun. 2020.

EDEN, A. et al. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. **Science**, v. 300, n. 5618, p. 455, 18 abr. 2003.

ERDOGAN, B.; WEBB, D. J. Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 1, p. 229-236, 8 fev. 2017.

ERICH KÖNIG, H.; LIEBICH, H.-G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. Tradução: Régis Pizzato. 6a. ed. [s.l.] artmed, 2016.

EYNARD, H. G. et al. Assessment of Colorectal Cancer Prognosis Through Nuclear Morphometry. **Journal of Surgical Research**, v. 154, n. 2, p. 345-348, jun. 2009.

FERREIRA, D. et al. Assessment of ERBB2 and TOP2 α gene status and expression profile in feline mammary tumors: findings and guidelines. **Ageing**, v. 11, n. 13, p. 4688-4705, 12 jul. 2019.

FILGUEIRA, K.D.; JÚNIOR, A.R. Neoformações da glândula mamária felina – parte I: neoplasias malignas e benignas. **Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 10, n. 33, p. 1-637, 2012.

FOALE, R; DEMETRIOU, J. **Saunders solutions in veterinary practice: Small animal oncology**. 1 ed. Londres: Elsevier, 2010.

FUJITA, M.; KANEDA, M. DNA methylation inhibitor causes cell growth retardation and gene expression changes in feline lymphoma cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 8, p. 1352-1358, 4 ago. 2017.

GAMEIRO, A.; URBANO, A. C.; FERREIRA, F. Emerging Biomarkers and Targeted Therapies in Feline Mammary Carcinoma. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 8, p. 164, 1 ago. 2021.

GARDEN, O. A. et al. Companion animals in comparative oncology: One Medicine in action. **The Veterinary Journal**, v. 240, p. 6-13, out. 2018.

GONÇALVES, D. G. Levantamento de casos de neoplasia mamária em felinos, diagnosticados no hospital veterinário da Universidade Federal de Campina Grande (Campus de Patos-PB), no período de 2003-2007. Monografia (Graduação), Universidade Federal de Campina Grande, 2008.

GUNDIM, L. F. EXPRESSÃO DE HER-2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE GATAS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

HANAHAH, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, mar. 2011.

HAYES, H.; MILNE, K.; MANDELL, C. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. **Veterinary Record**, v. 108, n. 22, p. 476-479, 30 maio 1981.

IKEGUCHI, M. et al. Nuclear profiles of cancer cells reveal the metastatic potential of gastric cancer. **The Journal of Pathology**, v. 192, n. 1, p. 19-25, 1 set. 2000.

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 97, p. 41-55, fev. 2016.

KARAMANOS, N. K. et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS Journal**, 23 mar. 2021.

KAUSHIK, N. et al. Proinvasive extracellular matrix remodeling for tumor progression. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 1, p. 40-47, 4 dez. 2018.

LEITE, N. G. et al. Prognostic Value of Intratumoral Collagen Quantification in Canine Oral Melanomas. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 38, n. 4, p. 188-192, dez. 2021.

LEVENTAL, K. R. et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 891-906, 25 nov. 2009.

LITTLE, S.E. **O Gato - Medicina Interna**. Tradução: Idilia Vanzellotti; Tradução: Rosane Gomes dos Santos Jacobson. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2015.

MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 2, p. 238-249, 24 jul. 2014.

MISDORP W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: *Ibid.* **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. 2 ed., v. 7, Geneva: World Health Organization, 1999.

MOMMERS, E. C. et al. Nuclear cytometric changes in breast carcinogenesis. **The Journal of Pathology**, v. 193, n. 1, p. 33-39, 1 jan. 2001.

NASCIMENTO, E. F. D.; SANTOS, R. D. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

NASCIMENTO, C.; FERREIRA, F. Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1876, n. 1, p. 188587, 1 ago. 2021.

OLIVEIRA, L. S. Aspectos epidemiológicos e imunomarcção de cox-2 em tumores mamários de gatas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

OVERLEY, B. et al. Association between Ovariectomy and Feline Mammary Carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 4, p. 560, 2005.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243-1253, 10 nov. 2014.

PIENTA, K. J.; COFFEY, D. S. Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. **Cancer**, v. 68, n. 9, p. 2012-2016, 1 nov. 1991.

PIFFKÒ, J. et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. **The Journal of Pathology**, v. 182, n. 4, p. 450-456, ago. 1997.

POLTAVETS, V. et al. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 9 out. 2018.

POROPATICH, K. et al. Nuclear size measurement for distinguishing urothelial carcinomas from reactive urothelium on tissue sections. **Diagnostic Pathology**, v. 11, n. 1, 30 jun. 2016.

RAHARISON, F.; SAUTET, J. Lymph drainage of the mammary glands in female cats.

Journal of Morphology, v. 267, n. 3, p. 292-299, 1 mar. 2006.

RANGER-MOORE, J. et al. Karyometry of nuclei from actinic keratosis and squamous cell cancer of the skin. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 25, n. 6, p. 353-361, 1 dez. 2003.

ROSEN, S. et al. Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. **PLoS One**, v. 15, n. 8, p. e0236516, 2020.

SANTOS, R. D. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

SIMEONOV, R.; SIMEONOVA, G. Nuclear cytomorphometry in feline mammary gland epithelial tumours. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 2, p. 296-300, fev. 2009.

STREFEZZI, R. D. F.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 3, p. 268-275, maio 2003.

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

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

VILLALOBOS, A.; KAPLAN, L. **Canine and feline geriatric oncology: honoring the human-animal bond**. Hoboken, NJ: Wiley, 2018.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 4 out. 2018.

ZAIDI, S. K. et al. Nuclear microenvironments in biological control and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 454-463, jun. 2007.

ZAPPULLI, V. et al. Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 1, p. 46-60, 16 abr. 2014.