



**FERNANDA REZENDE SOUZA**

**RELAÇÃO MASTÓCITOS E ANGIOGÊNESE EM  
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

**LAVRAS-MG  
2020**

**FERNANDA REZENDE SOUZA**

**RELAÇÃO MASTÓCITOS E ANGIOGÊNESE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS  
CANINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo

Orientador

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Coorientador

**LAVRAS-MG  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da  
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Fernanda Rezende.

Relação mastócitos e angiogênese em neoplasias mamárias caninas /

Fernanda Rezende Souza. - 2020.

49 p.

Orientador(a): Djeison Lutier Raymundo.

Coorientador(a): Geovanni Dantas Cassali.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Microambiente tumoral. 2. Tumor de mama. 3. Glândula mamária. I.

Raymundo, Djeison Lutier. II. Cassali, Geovanni Dantas. III. Título.

**FERNANDA REZENDE SOUZA**

**RELAÇÃO MASTÓCITOS E ANGIOGÊNESE EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS  
CANINAS  
MAST CELLS AND ANGIOGENESIS RELATION IN CANINE MAMMARY  
NEOPLASIAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Patologia Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2020.

Dra. Angélica Terezinha Barth Wouters – UFLA

Dra. Marina Rios de Araújo Campos – UFMG

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2020**

*Dedico este trabalho à minha avó Conceição Ribeiro de Souza (in memoriam) que foi meu maior exemplo de vida. Obrigada por tanto amor. As nossas lembranças me fortalecem todos os dias.  
Te amarei, sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos, proteção e cuidado com cada detalhe da minha vida.

Aos meus pais, que incansavelmente estiveram ao meu lado, fornecendo todo o apoio necessário. Por terem se privado tantas vezes da minha companhia e investido em minha educação. Vocês são meus maiores exemplos e tornaram mais leve a caminhada. Amo vocês infinitamente.

As minhas avós (*in memoriam*) por serem meus anjos. A vó Lé, apesar de tantos anos após sua partida, tenho a certeza de que a senhora me protege e me guia. A vó Conceição, que esteve presente durante os 18 meses do mestrado, mesmo que tão doente, a senhora foi minha maior força e motivação. Não via a hora de voltar pra casa só pra ficar mais um pouco em sua companhia. Vejo muito de vocês em mim, por isso tenho certeza que nunca estou só.

A minha irmã Rafaela por ser minha melhor amiga, pelas nossas conversas e por orar por mim. Te amo muito!

Ao meu namorado Luiz pelo incentivo, por ser amigo, companheiro e por toda a ajuda técnica que me deu neste trabalho. Pela paciência, por me arrancar risadas até em momentos difíceis e por muitas vezes acreditar que tudo daria certo, mesmo quando eu não acreditava nisso.

Aos meus amigos em especial, Adriana, Fran, Ivam, Matheus, Rayana e Vini pela preocupação e apoio constante quando eu mais precisei.

Ao meu orientador Djeison pela oportunidade de executar este trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Geovanni por ter acreditado em mim, pelos conselhos, aprendizado e suporte.

Aos professores Angélica, Flademir e Mary por me ensinarem tanto sobre Patologia de forma paciente e fascinante, vocês foram a base de tudo. Obrigada por todo aprendizado, convívio e incentivo.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica, em especial Ana Beatriz, Thaís e Vanessa por toda ajuda, apoio e amizade.

Ao Sr. Francisco, pelas “prosas” e por sempre ser tão solícito.

Aos colegas de pós-graduação pela convivência diária, troca de experiências e apoio na coleta do material.

Ao Laboratório de Patologia Comparada (LPC-ICB/UFMG) e CELULAVET por sempre me receberem bem e dispostos a ajudar.

Aos meus bichinhos, Hannah, Bia, Meg, Chloe, John e Thomas por me fazerem companhia infinitas vezes e significarem constante inspiração.

Às cadelas e seus tutores que participaram deste estudo, meu profundo respeito e gratidão pela cooperação.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e clínicas veterinárias parceiras pela confiança neste trabalho.

À UFLA por todos esses anos de oportunidades, aprendizados pessoais e profissionais e a tantas pessoas que tive a oportunidade de conhecer.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

## RESUMO

As neoplasias mamárias são o tipo tumoral mais frequente em cadelas e mulheres. As cadelas são consideradas excelente modelo espontâneo no estudo do câncer de mama. O microambiente tumoral tem sido estudado nos últimos anos para maior compreensão do desenvolvimento e progressão dessa doença. Os mastócitos são um tipo celular presente neste microambiente que podem promover as neoplasias por meio da liberação de fatores pró-angiogênicos presentes em seus grânulos. Do mesmo modo, a fibrose tumoral tem sido considerada como fator prognóstico em diferentes tipos de tumores. O presente trabalho objetiva verificar a relação entre mastócitos e angiogênese em neoplasias mamárias benignas e malignas avaliando o papel da degranulação e da microlocalização dos mastócitos em neoplasias mamárias caninas. As mamas avaliadas foram divididas em três grupos: grupo controle (n=46); grupo maligno (n=57) e grupo benigno (n=19). Também foram avaliados linfonodos sem alterações (n=59) e com metástases (n=6). A marcação de mastócitos, vasos sanguíneos e fibrose tumoral foram realizados por técnicas histoquímicas e avaliadas por *software* ImageJ versão 1.42q. A densidade total de vasos (P=0,03) e vasos peritumorais (P=0,05) foram maiores no grupo maligno. Houve ainda correlação positiva entre densidade de vasos intratumorais e totais e densidade de mastócitos. Diante desses achados pode ser concluído que uma maior densidade de mastócitos está relacionada à maior densidade de vasos sanguíneos e que estes são mais abundantes em neoplasias malignas reforçando o papel crucial da angiogênese no desenvolvimento neoplásico.

**Palavras-chave:** Microambiente tumoral. Glândula mamária. Cadela. Tumor de Mama.



## ABSTRACT

The mammary neoplasias are the most often tumor type in bitches and women. Female dogs are considered an excellent spontaneous model in the breast cancer study. The tumor microenvironment has been studied in the recent years to a greater understanding of the development and progression of this disease. Mast cells are a cell type present in this microenvironment that can promote neoplasms by releasing pro-angiogenic factors present in their granules. Likewise, tumor fibrosis has been considered a prognostic factor in different types of tumors. The present work aims to verify the connection between mast cells and angiogenesis in different histological types of mammary tumors by measuring the role of degranulation and microlocation in canine mammary glands tumors. The analyzed mammary glands were splitted into three groups: control group (n = 46); malignant group (n = 57) and benign group (n = 19). Lymph nodes without changes (n = 59) and with metastases (n = 6) were also evaluated. The staining of the mast cells, the blood vessels and the tumor fibrosis were performed by histochemical techniques and evaluated by ImageJ software version 1.42q. The total density of vessels (p = 0.03) and peritumoral vessels (p = 0.05) were higher in the malignant group. There was even a positive correlation between the intratumoral and total vessels and the mast cell density. In the face of these findings, we can conclude that a higher density of mast cells is related to a higher density of blood vessels and that these are more abundant in malignant neoplasms reinforcing the crucial role of angiogenesis in neoplastic development.

**Keywords:** Tumor microenvironment. Mammary gland. Bitch. Mammary gland tumor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Avaliação de mastócitos. A) Tumor primário, mastócitos granulados (seta). B) Mama controle, mastócitos degranulados (seta) e grânulos livres (asterisco). Azul de Toluidina. Obj. 40x.....25
- Figura 2** – Avaliação de mastócitos. A) Linfonodo sem alteração. B) Linfonodo com metástase. Mastócitos granulados (setas). Azul de Toluidina. Obj. 40x.....25
- Figura 3** – Avaliação da densidade de microvasos (setas amarelas) em tumores primários. A) Região intratumoral. B) Região peritumoral. Tricrômico de Gomori. Obj. 40x.....26
- Figura 4** – Identificação das áreas de fibrose: A) Grupo Controle (mama em repouso); B) Grupo 2 (carcinoma papilar invasor) – Tricrômico de Gomori, área de fibrose em verde (asterisco); C e D) Áreas de fibrose evidenciadas (em vermelho) com o auxílio do *software* ImageJ (Técnica – *Colour Deconvolution –Threshold*). Obj. 10x.....27
- Gráfico 1** – Número absoluto (n) de cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária durante o período de maio-2018 a agosto-2019, de acordo com a idade.....29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Diagnósticos histopatológicos de neoplasias cutâneas encontradas no estudo (maio-2018 a agosto-2019).....	28
<b>Tabela 2</b> – Número absoluto e frequência relativa de cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária durante o período de maio-2018 a agosto-2019 de acordo com a raça.....	29
<b>Tabela 3</b> – Número absoluto (n) de amostras de tumores de mama de cadela no grupo maligno, diagnosticados no período de maio-2018 a agosto-2019.....	30
<b>Tabela 4</b> – Número absoluto (n) de amostras de tumores de mama de cadela no grupo benigno, diagnosticados no período de maio-2018 a agosto-2019.....	30
<b>Tabela 5</b> – Distribuição e frequência dos tamanhos tumorais de acordo com o tipo histológico.....	31
<b>Tabela 6</b> – Efeitos do tipo de neoplasia na densidade de mastócitos.....	31
<b>Tabela 7</b> – Efeito da microlocalização de mastócitos granulados e degranulados nos grupos benigno e maligno.....	32
<b>Tabela 8</b> – Média dos valores de mastócitos granulados e degranulados encontrados nos linfonodos do grupo controle e metastáticos.....	32
<b>Tabela 9</b> – Média dos valores de vasos encontrados quanto à localização nas glândulas mamárias do grupo benigno e maligno.....	33
<b>Tabela 10</b> – Correlações entre os vasos localizados na área intratumoral, peritumoral e total com os mastócitos (total, degranulado intratumoral e peritumoral, granulado intratumoral e peritumoral, granulado total e degranulado total).....	34
<b>Tabela 11</b> – Média da área de fibrose entre grupos.....	34
<b>Tabela 12</b> – Respostas obtidas nos questionários aplicados.....	35

## LISTA DE SIGLAS

CAAF	Citologia aspirativa por agulha fina
CAF	Fibroblastos associados ao câncer ( <i>Cancer-associated fibroblast</i> )
CCE	Carcinoma de células escamosas
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CTM	Carcinoma em tumor misto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
FCFb	Fator de crescimento de fibroblasto básico
HE	Hematoxilina-eosina
HV	Hospital Veterinário
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LPC	Laboratório de Patologia Comparada
MCD	Densidade de mastócitos ( <i>Mast cell density</i> )
MEC	Matriz extracelular
MVD	Densidade microvascular ( <i>Microvascular density</i> )
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
SCF	Fator de células tronco ( <i>Stem cell factor</i> )
SPRD	Sem padrão racial definido
SPV	Setor de Patologia Veterinária
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMB	Tumor misto benigno
TSP	Porcentagem de estroma tumoral ( <i>Tumour stroma percentage</i> )
TVT	Tumor venéreo transmissível
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>Vascular endothelial growth factor</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1 Neoplasias mamárias em cadelas .....	14
2.2 Oncologia comparada .....	16
2.3 Microambiente tumoral na neoplasia mamária .....	17
2.4 Mastócitos no microambiente tumoral .....	17
2.5 Angiogênese na progressão tumoral .....	19
2.6 Fibrose tumoral .....	20
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>4. HIPÓTESE</b> .....	<b>21</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 Objetivos Gerais .....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
6.1 Seleção de amostras .....	22
6.2 Abordagem clínico-cirúrgica .....	22
6.3 Processamento histológico das amostras .....	22
6.4 Análise histopatológica.....	23
6.5 Delineamento experimental .....	23
6.5.1 Avaliação da densidade, localização e contagem diferencial de mastócitos.....	24
6.5.2 Avaliação da angiogênese tumoral.....	25
6.5.3 Análise da fibrose intratumoral .....	26
6.6 Questionário de avaliação .....	27
6.7 Análise estatística.....	27
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXO A</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a 4ª maior população de animais de companhia do mundo, estabelecida em 139,3 milhões de animais. Os cães são os mais populosos, com 54,2 milhões (ABINPET, 2018). O avanço da Medicina Veterinária em prevenção de doenças, nutrição e terapêutica são fatores relevantes para o aumento na expectativa de vida dos cães e gatos. Porém, o número de casos de tumores em animais de companhia tem aumentado consideravelmente, uma vez que o desenvolvimento de neoplasias é maior em animais senis. Estima-se que, aproximadamente, 45% dos cães idosos morrem em decorrência de diferentes tipos de tumores (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013). Assim, a oncologia é uma especialidade veterinária que vem ganhando notoriedade e apoio multidisciplinar na rotina clínica de pequenos animais, buscando avanço em diagnósticos e tratamentos, tendo em vista a qualidade de vida associada ao aumento da sobrevida.

Em cadelas não castradas os tumores de mama são o tipo mais frequente e mais de 70% são diagnosticados como malignos (NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017). Da mesma forma, em mulheres o câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente, com estimativa de 2,1 milhões de novos casos em 2018 (INCA, 2018). Prier e Brodey (1963) descreveram o potencial de utilização de cães como modelos espontâneos no estudo de diferentes tipos de neoplasias para humanos, incluindo as mamas. Ambas as espécies compartilham características biológicas dos tumores, como heterogeneidade, relações complexas entre célula neoplásica e sistema imune do hospedeiro e ocorrência de metástases, estas resultantes, muitas vezes, no óbito da paciente (GARDNER; FENGER; LONDON, 2016). Evidências recentes sugerem que as neoplasias são compostas por um estroma modificado, que circunda as células tumorais; o conhecimento sobre este microambiente tumoral torna-se essencial para a compreensão do desenvolvimento e a progressão da doença (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

Há poucos estudos que evidenciam o papel dos mastócitos nas neoplasias em cães, incluindo o tumor mamário. Essas células, quando presentes no microambiente tumoral, demonstram complexidade e plasticidade funcional em diferentes tipos de neoplasias em humanos (JOHANSSON et al., 2010). Keser et al. (2017) demonstraram que mastócitos intratumorais facilitam a invasão vascular e posterior metástase em carcinoma mamário invasivo de mulheres. Além disso, também eles são responsáveis por liberar fatores angiogênicos presentes em seus grânulos (CRIVELLATO; NICO; RIBATTI, 2008). Na Medicina, a associação entre presença de mastócitos e o aumento de neovascularização

neoplásica por meio da mensuração de densidade de microvasos (MVD) demonstrou significado prognóstico em melanoma e carcinoma de células escamosas esofágico (ELPEK et al., 2001; RIBATTI et al., 2003). Da mesma forma, a área de fibrose demonstrou ser também um fator prognóstico encontrado em neoplasias mamárias, com relação inversamente proporcional entre área estromal, tempo de sobrevida e tempo livre de doença (DE KRUIJF et al., 2011).

O papel dos mastócitos, considerando densidade, localização no microambiente e contagem diferencial correlacionado a angiogênese e fibrose em neoplasias mamárias malignas e benignas de cadelas, ainda não foi avaliado. Estudos que esclareçam este microambiente tumoral fornecerão informações relevantes para o diagnóstico, contribuindo, conseqüentemente, para melhor suporte aos pacientes.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Neoplasias mamárias em cadelas**

Os tumores mamários têm desenvolvimento espontâneo em cadelas, sendo o tipo mais comum em fêmeas não castradas, caracterizando 50 a 70% de todas as neoplasias na espécie. Em cães machos a incidência varia de 0,0 a 2,7% (MERLO et al., 2008). Entretanto, a frequência pode ser variável, dependendo da prática de ovariosalpingo-histerectomia (OSH), com números bastante reduzidos em países em que sua realização é frequente (SLEECKX et al., 2011). Em condições fisiológicas, os hormônios ovarianos estimulam o crescimento das glândulas mamárias. Porém, o efeito proliferativo no epitélio glandular pode favorecer o desenvolvimento neoplásico. A cada ciclo estral da cadela este estímulo se repete, tornando o animal suscetível a carcinogênese (QUEIROGA et al., 2005). Schneider; Dorn e Taylor (1969) observaram que cadelas submetidas à OSH antes do primeiro ciclo estral apresentaram risco de 0,5% de desenvolvimento de neoplasia mamária, sendo este risco aumentado para 8% e 26% em cadelas castradas após o primeiro e depois do segundo estro, respectivamente. Entretanto, a OSH nas cadelas após 2,5 anos de idade não apresenta efeito protetor. Progestágenos exógenos utilizados para evitar estro podem aumentar consideravelmente a ocorrência de tumores mamários, induzindo efeito semelhante à progesterona endógena (SORENMO, 2003).

Em relação à idade, cadelas de meia idade e idosas são mais acometidas, sendo a neoplasia mamária mais comumente observada de oito a 10 anos de idade (CHANG et al.,

2005; SLEECKX et al., 2011). Antes dos cinco anos a ocorrência de tumores malignos é considerada rara (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Muitos fatores ainda são contraditórios quando considerados os fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias como, por exemplo, a predisposição racial. Alguns autores evidenciam um risco maior em animais de raça definida, como Poodle, Cocker Spaniel, Springer Spaniel Inglês, Pastor Alemão, Maltês, Yorkshire Terrier e Dachshund (SLEECKX et al., 2011). Já outros apontam os cães de raças mistas como mais predispostos a tumores mamários (PASTOR et al., 2018). Entretanto, este fato pode ser explicado pela variação no perfil populacional atendido em diferentes regiões geográficas e ano de realização do estudo, considerando a variedade de raças populares em cada época.

Clinicamente, os tumores de mamas nas cadelas são facilmente detectáveis como nódulos a massas de diferentes tamanhos, únicos ou múltiplos, localizados em uma ou ambas as cadeias mamárias. As glândulas abdominais caudais e inguinais são mais frequentemente afetadas (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Segundo Sorenmo et al. (2009) mais de 60% dos tumores mamários em cadelas são múltiplos. Pode haver ulceração da pele, secundária a traumatismo e crescimento invasivo de tumores malignos (NUNES et al., 2018; SORENMO, 2003). É importante avaliar a condição clínica geral do animal, colhendo informações sobre histórico, ciclo reprodutivo, data provável de percepção das lesões e se houve lesões tumorais precedentes (FERREIRA et al., 2003; CASSALI et al., 2014). Linfonodos regionais devem ser minuciosamente examinados, pois a metástase nodal é considerada um dos principais fatores prognósticos em mulheres e cadelas, possuindo relação direta com tempo de sobrevida (ARAÚJO et al., 2015; BESERRA et al., 2016). Metástase distante ocorre mais frequentemente para pulmões, mas outros órgãos também podem estar envolvidos, como fígado, rins, baço, pleura, sistema nervoso central e ossos (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; NUNES et al., 2018). Exames de imagem, como radiografia torácica em pelo menos três projeções e ultrassonografia abdominal, auxiliam na pesquisa de metástases distantes (SORENMO, 2003).

Embora a CAAF (citologia aspirativa por agulha fina) possa ser usada para diferenciar neoplasias mamárias de outras lesões (neoplasias de pele e subcutâneo, ou processos inflamatórios) o diagnóstico definitivo é obtido por meio da histopatologia (SLEECKX et al., 2011). Vários métodos de classificação de tumores de mama em cadelas foram propostos ao longo dos últimos anos, sendo os mais recentes apresentados por Goldschmidt et al. (2011) e Cassali et al. (2014). Estes últimos realizaram abordagem multidisciplinar sobre anatomopatologia, clínica e cirurgia veterinária, com aspectos diagnósticos e clínicos, de



forma que a classificação histopatológica dos tumores possui associação com prognóstico e tratamento. As lesões podem ser classificadas em não neoplásicas e neoplásicas benignas e malignas (CASSALI et al., 2014). Quando presentes múltiplos nódulos ou massas, esses devem ser avaliados separadamente, pois uma determinada cadela pode possuir diferentes tipos tumorais (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011). O prognóstico é influenciado por diferentes fatores, tais como idade do animal, estadiamento clínico, tipo e grau histológico, índice mitótico, metástase regional e/ou à distância e marcadores moleculares (CASSALI et al., 2014).

A cirurgia é considerada o tratamento de escolha para a maioria dos tumores mamários em cadelas, uma vez que pode ser curativa se as margens estiverem livres e a neoplasia ainda não tenha realizado metástase (SLEECKX et al., 2011). A técnica cirúrgica será definida de acordo com tamanho tumoral, localização na cadeia mamária, extensão e drenagem linfática (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). A quimioterapia é indicada para cadelas com neoplasias mamárias de prognóstico desfavorável e estadiamento clínico avançado (CASSALI et al., 2014). Porém não há protocolos padronizados, considerando a heterogeneidade desse tipo de tumor e a resposta individual (SORENMO, 2003).

## **2.2 Oncologia comparada**

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres e a principal causa de morte relacionada a tumores entre as mulheres no mundo, sendo estimados 627 mil óbitos em 2018 (INCA, 2019). Características epidemiológicas, clínicas e prognósticas são muito semelhantes entre o câncer de mama de mulheres e cadelas (VASCELLARI et al., 2016). As semelhanças incluem surgimento espontâneo da doença, idade, influência hormonal e curso clínico. Os fatores que influenciam o prognóstico também são similares, como estágio clínico, tamanho do tumor e metástase nodal (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018). Os cães compartilham o mesmo ambiente que humanos, sendo expostos aos mesmos carcinógenos (LIU et al., 2014). Além disso, ambas as espécies enfrentam desafios terapêuticos, onde metástase e resistência a drogas são importantes causas de insucesso no tratamento da doença. Assim, os tumores mamários de cadelas são um importante modelo de estudo para o câncer de mama em mulheres e vice-versa (PRIER; BRODEY, 1963; SORENMO et al., 2009).

### **2.3 Microambiente tumoral na neoplasia mamária**

O microambiente tumoral no câncer de mama é bastante complexo, constituído por células neoplásicas em proliferação associadas a células não tumorais (estroma), que incluem fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias infiltrantes, adipócitos e componentes da matriz extracelular (MEC) (MITTAL; BROWN; HOLEN, 2018). As células neoplásicas promovem resposta imune, que culmina com aumento de células inflamatórias e fibroblastos no entorno dessas células tumorais (FAKHRJOU et al., 2016). As células inflamatórias atuam em conjunto com as células neoplásicas, estromais e endoteliais no microambiente tumoral para criar um meio crítico para a sobrevivência, desenvolvimento e disseminação da neoplasia (RIBATTI, 2013).

### **2.4 Mastócitos no microambiente tumoral**

Os mastócitos são células imunes, possuem linhagem hematopoiética com origem na medula óssea e, em condições fisiológicas, não são encontrados na corrente sanguínea. Células precursoras migram para diferentes tecidos e se diferenciam em células maduras granuladas sob a influência de muitos fatores, entre eles o fator de célula-tronco (SCF) (KRYSTEL-WHITTEMORE; DILEEPAN; WOOD, 2016). Essas células maduras são encontradas associadas a vasos e nervos em tecidos que possuem contato com o meio externo como, por exemplo, pele e mucosas (VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE et al., 2008). Os mastócitos são redondos a alongados, com diâmetro de 8-20  $\mu\text{m}$ , facilmente reconhecidos por microscopia de luz pela caracterização de seus grânulos metacromáticos, que podem ser evidenciados com a coloração de Azul de Toluidina (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012). O citoplasma dessas células contém aproximadamente 50 a 200 grânulos, que armazenam mediadores inflamatórios, como histamina, heparina, citocinas e proteases neutras (DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014).

Os mastócitos participam de distúrbios inflamatórios alérgicos ou crônicos, bem como da resposta do hospedeiro a neoplasias. Estudos ultraestruturais indicam que, nessas situações, mastócitos maduros podem liberar o conteúdo granular, mas retém parte dos grânulos no citoplasma, processo conhecido como degranulação fragmentada, diferente da degranulação anafilática, em que todo o conteúdo citoplasmático granular é liberado durante as reações alérgicas (DVORAK et al., 1994). A liberação em amplo espectro durante a degranulação geralmente é desvantajosa para o desenvolvimento do tumor (RIGONI; COLOMBO;

PUCILLO, 2015). A distinção entre os mecanismos de liberação depende de diferentes sinais, provenientes de antígenos, citocinas e fatores de crescimento (THEOHARIDES et al., 2007). Células tumorais são capazes de aumentar a produção de SCF, estimulando a migração dos mastócitos, a proliferação e a degranulação (HIROMATSU; TODA, 2003).

A associação entre mastócitos e câncer ainda é contraditória, pois a função dos mastócitos durante a progressão tumoral é complexa e demonstra plasticidade, promovendo ou protegendo contra a neoplasia (JOHANSSON et al., 2010). Os mastócitos são as primeiras células inflamatórias a infiltrarem no microambiente tumoral e sua presença está relacionada a prognóstico reservado em diferentes tipos tumorais em humanos, como câncer de próstata, cérvix, bexiga urinária e mama (RIBATTI, 2013). Entretanto, o contrário já foi observado em alguns tipos de câncer de mama em mulheres (DABIRI et al., 2004; DELLA ROVERE et al., 2007). Um dos fatores mais significativos pelo qual os mastócitos podem influenciar o desenvolvimento neoplásico é a estimulação da angiogênese. Há diferentes vias de interação, com liberação de fatores pró-angiogênicos, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto básico (FCFb), fator de crescimento transformador  $\beta$ , (TGF- $\beta$ ), IL-8, triptase, quimases, proteinases e heparina. Já a histamina induz aumento da permeabilidade microvascular (DYDUCH; KACZMARCZYK; OKOŃ, 2012).

Em humanos, a participação efetiva dos mastócitos na angiogênese e, conseqüentemente, na progressão do câncer, tem sido confirmada em diferentes tipos neoplásicos, como carcinoma colorretal, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas e melanoma (TOMITA; MATSUZAKI; ONITSUKA, 2000; CH'NG et al., 2006; MAURO et al., 2008). A angiogênese medida como MVD em carcinoma endometrial de mulheres foi altamente correlacionada com contagem de células positivas para triptase e foi observado que esses parâmetros crescem com a progressão tumoral (RIBATTI et al., 2005). Nas neoplasias mamárias malignas de cadelas foi encontrada correlação positiva entre a densidade microvascular e mastócitos, sugerindo que estas células estão associadas à angiogênese, assim como no câncer de mama em mulheres (LAVALLE et al., 2010).

O impacto clínico dos mastócitos é ainda mais complexo, pois existe significado distinto em mastócitos intratumorais e peritumorais (DYDUCH; KACZMARCZYK; OKOŃ, 2012). Johansson et al. (2010) relataram significância prognóstica na localização dos mastócitos no parênquima tumoral em câncer de próstata humano, em que os casos de alta densidade intratumoral obtiveram melhor prognóstico e os casos de alta densidade de mastócitos peritumorais obtiveram prognóstico reservado. Além disso, maior densidade de

mastócitos em neoplasias de cães já foi relacionada à malignidade em hemangiossarcoma e adenocarcinoma mamário, quando comparados a hemangioma e adenoma mamário, respectivamente (WOLDEMESKEL; RAJEEV, 2010). Porém, mais estudos são necessários para compreender o real papel dos mastócitos nas neoplasias mamárias de cadelas bem como nas metástases.

## **2.5 Angiogênese na progressão tumoral**

A angiogênese é a formação de novos vasos a partir de componentes preexistentes, como capilares e vênulas, em um processo complexo de múltiplas etapas (RESTUCCI; DE VICO; MAIOLINO, 2000). Em neoplasias ela se torna essencial para o fornecimento de nutrientes e oxigênio, contribuindo para o crescimento neoplásico e, posteriormente, metástase (IM et al., 2011; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012). Folkman (1971) publicou que as neoplasias são dependentes de angiogênese, sendo incapazes de se desenvolver além de 2,0 mm<sup>3</sup> sem a formação de novos vasos e que a inibição deste processo poderia ter significado terapêutico. Células endoteliais em microambiente tumoral proliferam 30 a 40 vezes mais rápido quando comparadas com a angiogênese fisiológica (RESTUCCI; DE VICO; MAIOLINO, 2000).

Vasos neoformados no microambiente tumoral apresentam anormalidades estruturais e funcionais, permitindo hemorragia e predispondo a permeabilidade e transporte de células neoplásicas para a corrente sanguínea (RIBATTI et al., 2007). Em condições fisiológicas, a formação de novos vasos requer o equilíbrio de moduladores positivos e negativos, enquanto que, em condições patológicas, há um desequilíbrio provocado, principalmente pela liberação de fatores de crescimento específicos por células neoplásicas e inflamatórias, especialmente mastócitos, estimulando a angiogênese (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012).

Os mastócitos liberam uma variedade de fatores pró-angiogênicos e a densidade de mastócitos (MCD) está correlacionada com a extensão da angiogênese em tumores em humanos, como já descrito nas seções anteriores. Portanto, esta é uma importante ferramenta prognóstica utilizada na medicina humana (RESTUCCI; DE VICO; MAIOLINO, 2000). No câncer de mama de mulheres a correlação da angiogênese com metástase e prognóstico desfavorável tem sido extensivamente estudada (UZZAN et al., 2004). Alguns estudos em Medicina Veterinária correlacionam mastócitos e angiogênese no microambiente tumoral, como por exemplo, melanoma, tumor venéreo transmissível (TVT) e neoplasias malignas de mama (MUKARATIRWA et al., 2006a; MUKARATIRWA et al., 2006b; LAVALLE et al.,

2010). No tumor de mama em cadelas, mastócitos acumulados no tecido tumoral estavam intimamente associados a vasos sanguíneos e a angiogênese contabilizada pela MVD aumentou em proporção direta a MCD, sugerindo que há influência desses dois fatores no crescimento, na invasão e na formação de metástase (IM et al., 2011).

## **2.6 Fibrose tumoral**

A lesão tecidual desencadeia processos reparativos a fim de reestabelecer a estrutura e a função do órgão afetado. Os danos teciduais podem induzir acúmulo anormal e excessivo de constituintes da matriz extracelular como, por exemplo, colágeno, resultando no desenvolvimento de fibrose (CAJA et al., 2018). Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são células abundantes no microambiente tumoral, sendo fenotipicamente distintos dos fibroblastos associados à cicatrização fisiológica de feridas (CHANDLER et al., 2019; KALLURI, 2016). A ativação e o recrutamento dos CAFs dependem de mediadores químicos produzidos pelas células neoplásicas e pelas células imunes presentes no estroma tumoral (ROY; BERA, 2016). A função dos CAFs no microambiente tem sido relatada como complexa e bimodal, podendo promover ou restringir o tumor (KALLURI, 2016). Lebleu e Kalluri (2018) evidenciaram que os fibroblastos são ativados na fase inicial do desenvolvimento neoplásico. Nesse sentido, conforme o tumor cresce o processo de reparo feito por essas células pode estimular o crescimento tumoral, uma vez que as células neoplásicas utilizam os fatores de crescimento secretados pelos CAFs para promover a própria sobrevivência e a proliferação. Há aumento da angiogênese e facilitação de metástase via vascular por meio da secreção de VEGF pelos fibroblastos ativos (CHANDLER et al., 2019).

A porcentagem de estroma tumoral (TSP) demonstrou ter valor prognóstico em diferentes tipos de neoplasias em humanos, como o carcinoma de células escamosas esofágico e o câncer colorretal (PARK et al., 2014; WANG et al., 2012). O mesmo foi observado em diferentes tipos tumorais de neoplasias mamárias de mulheres, em que a TSP mostrou-se inversamente proporcional à recorrência e menor tempo de sobrevida, mostrando ser um fator prognóstico independente para o câncer de mama (DE KRUIJF et al., 2011; DEKKER et al., 2013; GUJAM et al., 2014; MOORMAN et al., 2012). Recentemente De Souza et al. (2018) avaliaram a porcentagem de fibrose em tumores mamários de cadelas, demonstrando relação com tumores mais agressivos podendo indicar, portanto, o uso da análise de TSP para fins prognósticos. A determinação é reproduzível e pode ser incorporada na avaliação histopatológica de rotina,

auxiliando na determinação do prognóstico dos pacientes (DE KRUIJF et al., 2011; DEKKER et al., 2013).

### **3. JUSTIFICATIVA**

Em decorrência da alta densidade populacional canina e ocorrência de tumores de mama na espécie, a observação de mastócitos nas lesões tumorais e sua relação com a angiogênese poderá acrescentar informações que contribuirão para o diagnóstico e o prognóstico deste tipo de neoplasia.

### **4. HIPÓTESE**

Acredita-se que há correlação positiva entre a densidade, degranulação e microlocalização de mastócitos e angiogênese em neoplasias mamárias de cadelas. Além disso, a fibrose estaria presente em maior proporção em neoplasias malignas.

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivos Gerais**

Estudar a relação mastócitos, angiogênese e fibrose em neoplasias mamárias de cadelas.

#### **5.2 Objetivos específicos**

- Verificar a distribuição dos mastócitos (intratumoral e peritumoral) e densidade, com contagem diferencial (degranulados e granulados) e sua relação com a angiogênese em neoplasias mamárias de cadelas.
- Quantificar os mastócitos em linfonodos regionais com metástase e sem alterações microscópicas aparentes, realizando a contagem diferencial (degranulados e granulados).
- Analisar a distribuição (intratumoral e peritumoral) dos microvasos em tumores primários.

- Avaliar a proporção de fibrose em neoplasias mamárias de cadelas, comparando com a proporção de tecido conjuntivo denso de mamas sem alterações.
- Analisar questionários aplicados a tutores quanto a aspectos reprodutivos de cadelas submetidas à mastectomia para remoção de neoplasia mamária, bem como a percepção dos tutores sobre a doença.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1 Seleção de amostras**

Foram selecionadas seis clínicas veterinárias do município de Lavras-MG e o Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras (HV-UFLA) para participação por concessão de peças cirúrgicas de glândulas mamárias provenientes de mastectomias realizadas em cadelas. O projeto foi aprovado pelo CEUA-UFLA (Comissão de Ética no Uso de Animais) sob o protocolo nº 022/19. As coletas foram realizadas no período de maio de 2018 a agosto de 2019. Os tutores foram previamente informados sobre os objetivos do projeto para consentimento da participação. Os médicos veterinários participantes receberam instruções para o preenchimento de ficha específica, que incluía dados sobre o tutor, animal e informes clínicos, tais como técnica cirúrgica realizada, exames complementares e outras informações relevantes (ANEXO A). A ficha e as amostras eram recolhidas conjuntamente.

### **6.2 Abordagem clínico-cirúrgica**

Os médicos veterinários participantes do projeto determinaram o tipo de técnica cirúrgica avaliando o tamanho do tumor, sua localização na cadeia mamária, drenagem linfática e estado clínico do paciente. Condutas anestésicas, manejo pré e pós-operatórios também foram definidos por cada profissional, de acordo com critérios de experiência pessoal. As cadelas não foram submetidas a protocolos quimioterápicos antes da cirurgia.

### **6.3 Processamento histológico das amostras**

As peças cirúrgicas foram encaminhadas ao Setor de Patologia Veterinária (SPV-UFLA) logo após exérese cirúrgica. As peças cirúrgicas foram fotografadas, identificadas e armazenadas em formol tamponado a 10% por no máximo 48 horas. Em seguida, as glândulas

mamárias e linfonodos eram mensurados, incluindo massas e nódulos encontrados e toda a peça era tingida com Nanquim (Acrilex®) para posterior avaliação da margem cirúrgica. Para mensuração da peça, nódulos e linfonodos foram considerados comprimento, largura e altura, sendo preconizado no mínimo duas dimensões. Informações referentes a lesões em pele (ex.: ulceração, alopecia, nódulos) foram registradas no momento da clivagem. Todas as mamas localizadas na peça enviada foram clivadas para avaliação histológica, mesmo quando não eram encontradas alterações durante o exame macroscópico. Mamas com resistência ao corte (duras ou com áreas duras) passaram por processo de descalcificação utilizando EDTA 20% com acompanhamento até desaparecimento da resistência ao corte. Após fixação completa do material clivado, os cassetes eram encaminhados para processamento rotineiro em equipamento histotécnico; emblocados em parafina; cortados em micrótomo (Olympus® CUT 4055) a 3µm. As lâminas histológicas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas em microscopia de luz.

#### **6.4 Análise histopatológica**

As lâminas foram avaliadas no LPC-ICB-UFMG sendo considerado para classificação histológica o consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2014). Todos os linfonodos foram submetidos à análise histológica para investigação de metástase ou quaisquer outras alterações.

#### **6.5 Delineamento experimental**

As mamas selecionadas foram divididas em três grupos. Grupo controle com mamas sem alterações, ou seja, mamas histologicamente normais encontradas ao longo da cadeia mamária das cadelas; grupo benigno e maligno compostos por neoplasias mamárias diagnosticadas como benignas e malignas, respectivamente. Os tipos tumorais presentes em cada grupo abrangem as neoplasias descritas no consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2014). Além disso, os linfonodos foram classificados em dois grupos: controle e metastático. Foram selecionadas lâminas histológicas com maior representatividade de cada amostra. Os blocos de parafina correspondentes a essas lâminas foram selecionados e recortados em série, obtendo-se duas novas lâminas para execução de técnicas histoquímicas. As amostras selecionadas para o

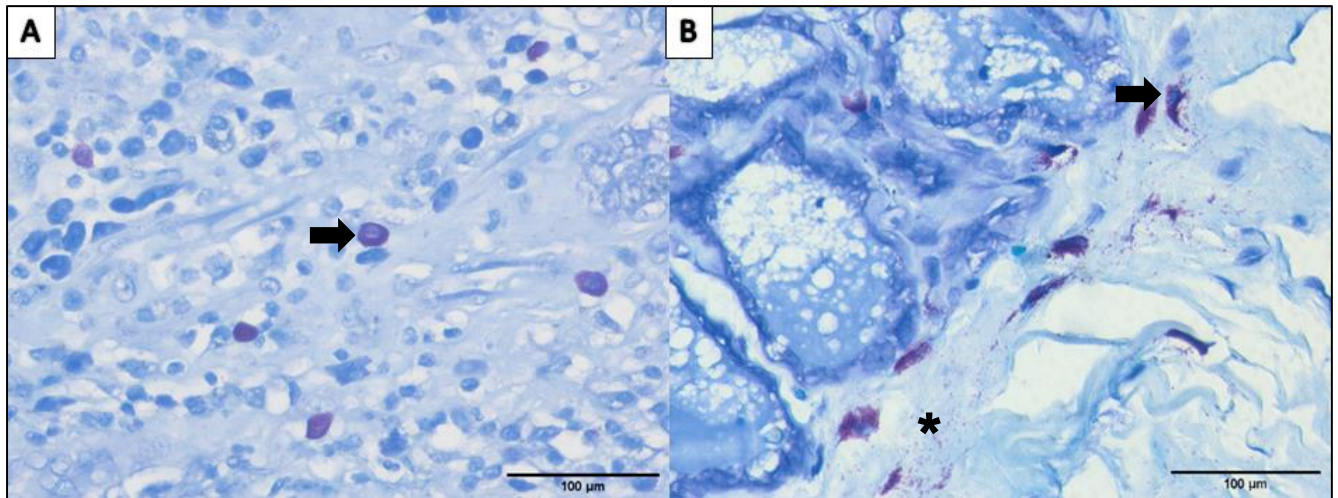


estudo foram avaliadas quanto à densidade, localização e contagem diferencial de mastócitos, angiogênese e fibrose tumoral.

### **6.5.1 Avaliação da densidade, localização e contagem diferencial de mastócitos**

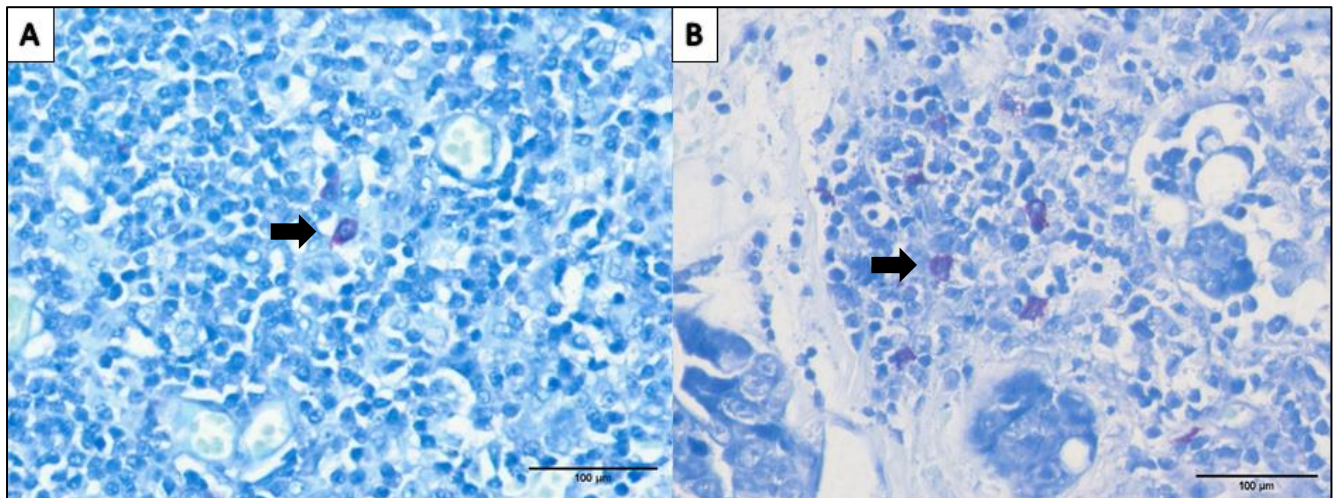
Para evidenciação dos mastócitos, as lâminas selecionadas foram coradas pela técnica histoquímica de Azul de Toluidina (0,1%). Foram escolhidos dez campos *hotspot* utilizando a objetiva de 10x em áreas intratumorais e peritumorais em tumores primários, totalizando 20 campos por lâmina. Já nos linfonodos e mamas do grupo controle foram apenas 10 campos por lâmina. A objetiva de 10x foi utilizada para identificação dos campos *hotspot* e em seguida, objetiva de 40x para captura das fotomicrografias. As imagens foram capturadas em câmera acoplada a microscópio óptico (Olympus BX-43 / Olympus Q-Color 5). Quando ausentes os campos *hotspot*, os mastócitos eram contados em campos aleatórios. Mastócitos intratumorais foram determinados como aqueles em contato direto com células tumorais, no interior dos ninhos de células neoplásicas e no espaço estromal, enquanto os peritumorais foram definidos como aqueles contidos no tecido da margem tumoral em até 2,0 mm (KESER et al., 2017). A contagem diferencial de mastócitos granulados e degranulados foi realizada por meio da análise morfológica destas células. Mastócitos com coloração irregular, ou seja, metacromasia menos intensa, com evidenciação nuclear, descontinuidade de membrana com grânulos fora do limite celular foram considerados como degranulados. Mastócitos granulados foram classificados como aqueles redondos a ovais, com uniformidade de coloração, ou seja, metacromasia densa, contorno nuclear fraco e membrana íntegra sem extrusão granular (FUENTES et al., 2015). Após captura das imagens, a contagem total e diferencial foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ versão 1.42q (Figura 1). A MCD para cada caso foi expressa pela média dos campos analisados.

Figura 1 – Avaliação de mastócitos. A) Tumor primário, mastócitos granulosos (seta). B) Mama controle, mastócitos degranulados (seta) e grânulos livres (asterisco). Azul de Toluidina. Obj. 40x.



Fonte: do autor (2020).

Figura 2 – Avaliação de mastócitos. A) Linfonodo sem alteração. B) Linfonodo com metástase. Mastócitos granulosos (setas). Azul de Toluidina. Obj. 40x.



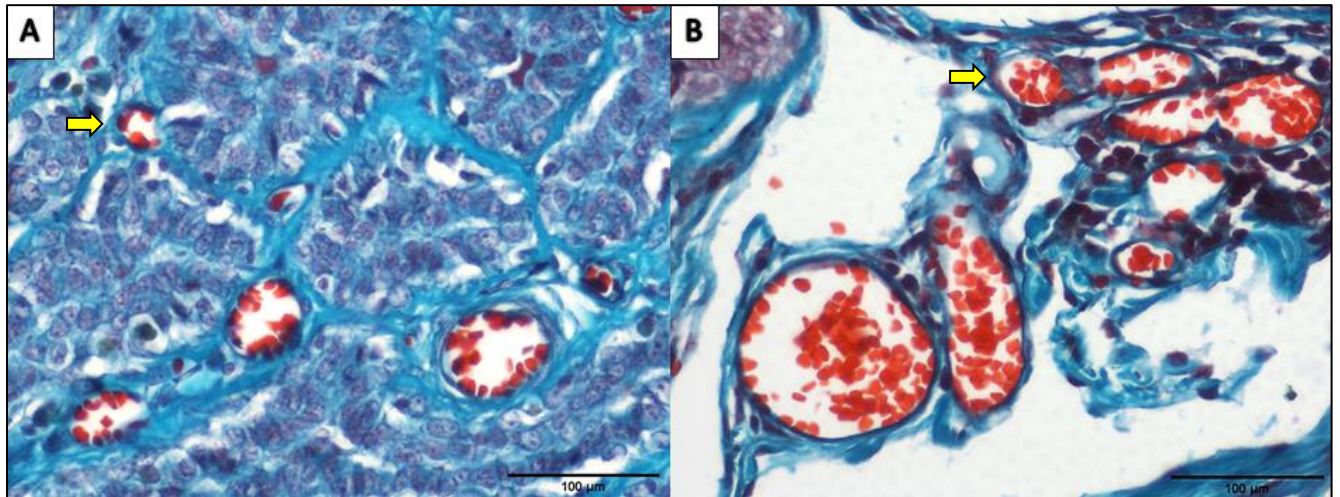
Fonte: do autor (2020).

### 6.5.2 Avaliação da angiogênese tumoral

Para análise da densidade de vasos sanguíneos nos tumores primários, as lâminas foram selecionadas e coradas pela técnica histoquímica de Tricrômico de Gomori. Foram identificados dez campos *hotspot* em áreas peritumorais e intratumorais na objetiva de 10x, totalizando 20 campos por lâmina, e então realizada captura das imagens em objetiva de 40x. As fotomicrografias obtidas foram analisadas no *software* ImageJ versão 1.42q para contagem dos vasos sanguíneos. Foram considerados como vasos sanguíneos, células endoteliais

coradas e vasos com lúmen contendo pelo menos uma hemácia – Figura 3 (RUSSO et al., 2011). A densidade de vasos sanguíneos para cada caso foi expressa pelo valor médio (número total de microvasos/20 campos).

Figura 3 – Avaliação da densidade de vasos (setas amarelas) em tumores primários.  
A) Região intratumoral. B) Região peritumoral. Tricrômico de Gomori. Obj. 40x.

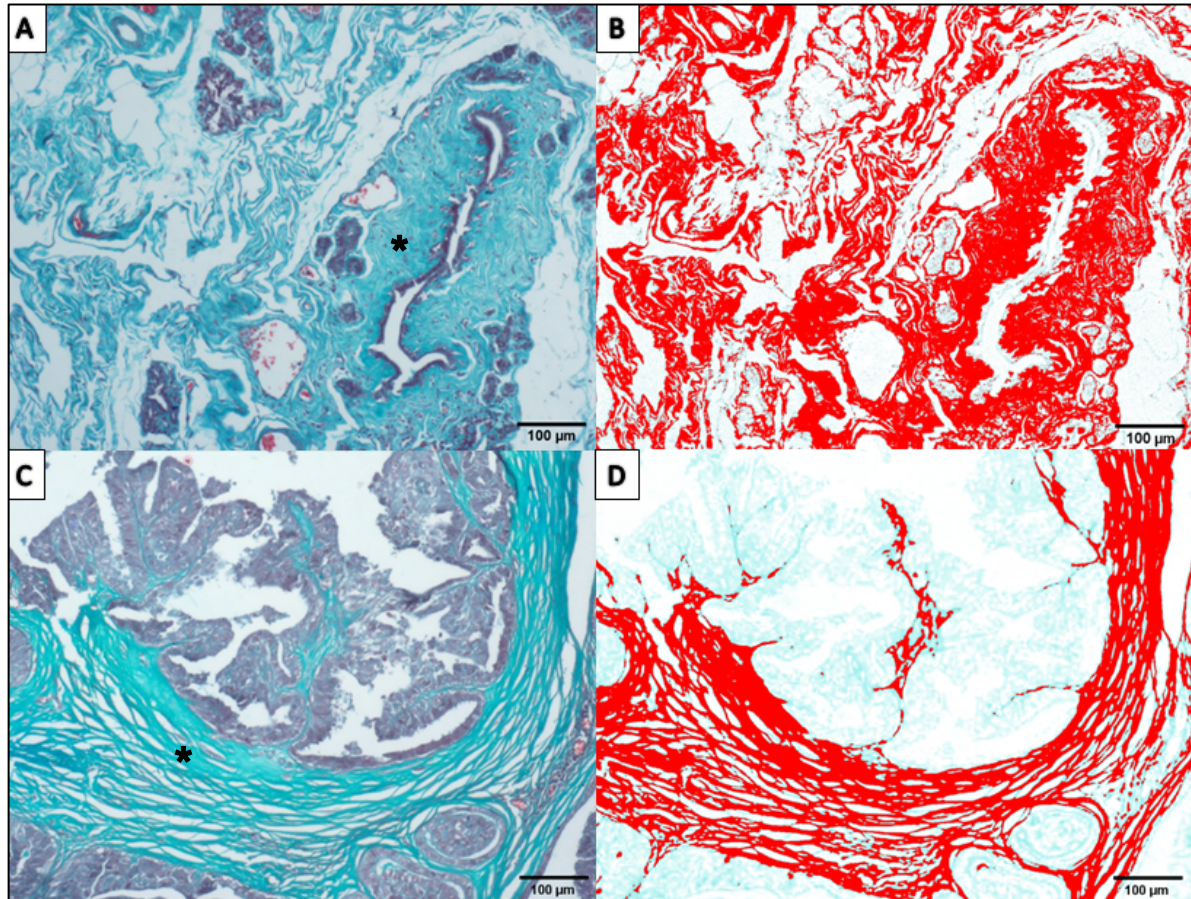


Fonte: do autor (2020).

### 6.5.3 Análise da fibrose intratumoral

Para análise da fibrose as lâminas selecionadas foram coradas com Tricrômico de Gomori. Capturaram-se três imagens em objetiva de 10x de áreas aleatórias contendo tecido conjuntivo denso em mamas do grupo controle, benigno e maligno. O cálculo da porcentagem de cada área fibrosa foi obtido por meio do *software* ImageJ versão 1.42q, (Figura 4) obtendo-se a média das três imagens capturadas para determinar um valor final para cada amostra analisada, como descrito anteriormente (DE SOUZA et al., 2018).

Figura 4 – Identificação das áreas de fibrose e tecido conjuntivo denso: A e B) Grupo Controle (mama em repouso); C e D) Grupo 2 (carcinoma papilar invasor). Tricrômico de Gomori, área de tecido conjuntivo denso (A) e fibrose (C) em verde (asterisco); áreas de fibrose evidenciadas em vermelho (B e D) com o auxílio do *software* ImageJ (Técnica – *Colour Deconvolution – Threshold*). Obj. 10x.



Fonte: do autor (2020).

## 6.6 Questionário de avaliação

Um questionário elaborado foi aplicado a todos os tutores cujas cadelas foram incluídas no estudo. No questionário estão presentes informações sobre histórico reprodutivo e percepção dos tutores sobre o câncer em animais de companhia. O questionário foi aplicado após a mastectomia e com autorização dos participantes, enviado via e-mail ou realizado por meio de ligação telefônica.

## 6.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS versão 19.0. Análises descritivas são apresentadas como média  $\pm$  erro padrão. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Variáveis com distribuição normal foram comparadas entre os grupos por análise de variância de um fator. Se o resultado da análise de variância foi significativo, utilizou-se o Teste Tukey como teste *post hoc*. Dados não paramétricos foram comparados entre grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Para todas as variáveis analisadas com diferença significativa no teste de Kruskal-Wallis foi avaliada a significância entre pares de grupos pelo teste de Mann-Whitney. A análise de correlação de Spearman foi utilizada para analisar a relação entre variáveis contínuas, foi aplicado para avaliar a correlação entre a densidade de vasos total, intra e peritumoral e a densidade de mastócitos total, intra e peritumoral, degranulado e granulado. Diferenças significativas foram indicadas por probabilidade de  $P \leq 0,05$ .

## 7 RESULTADOS

Foram coletadas glândulas mamárias de 76 cadelas durante o período de maio de 2018 a agosto de 2019. Amostras cuja remoção cirúrgica não contemplou a retirada de linfonodo regional e aquelas que receberam diagnóstico de neoplasias não mamárias foram excluídas do estudo. Desta forma, foram excluídas 34,21% (26/76) das cadelas, sendo 57,69% (15/26) das exclusões por ausência de linfonodo regional e 42,31% (11/26) por diagnóstico de tumor de pele. Os dados de neoplasias cutâneas diagnosticadas estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Diagnósticos histopatológicos de neoplasias cutâneas encontradas no estudo (maio-2018 a agosto-2019).

<b>Nº de casos</b>	<b>Diagnóstico histopatológico</b>
05	Hemangiossarcoma
03	Carcinoma de células escamosas
02	Mastocitoma (grau II e grau III)
01	Cisto infundibular
01	Hemangioma cavernoso
01	Tumor venéreo transmissível

Fonte: do autor (2019).

Quanto às características epidemiológicas, cadelas sem padrão racial definido (SPRD) foram as mais acometidas, representando 70,0% (35/50) dos casos. As demais raças estão demonstradas na Tabela 2. A idade variou de 5 a 18 anos (média de 9 anos e 8 meses  $\pm$  3 anos

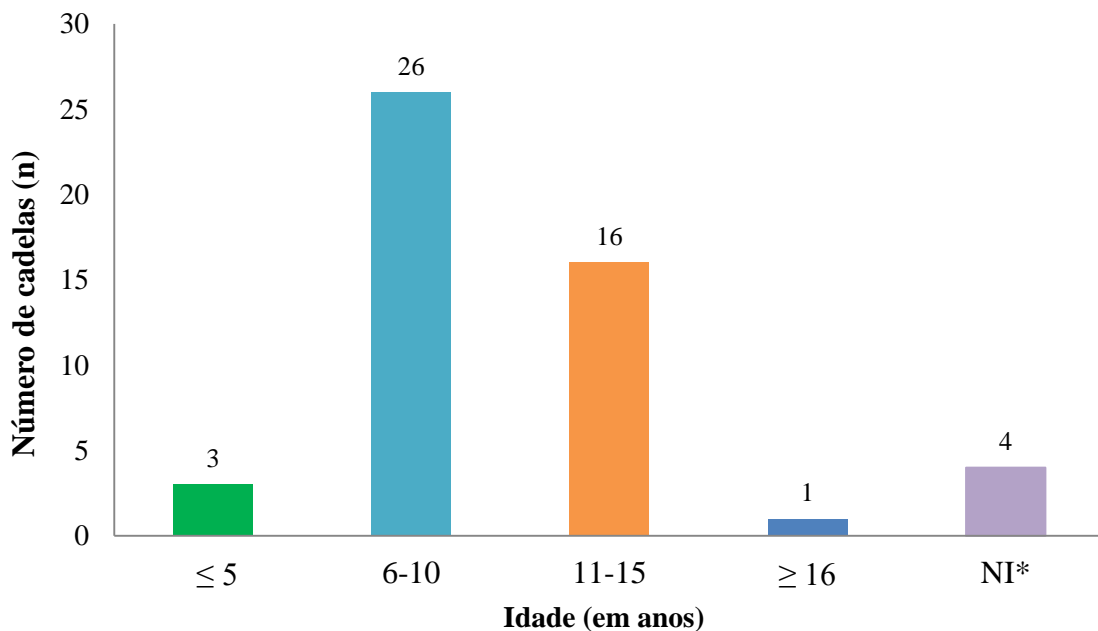
e 1 mês), com maior frequência de cadelas de 6 a 10 anos de idade, representando 52,0% (26/50). Em quatro casos não havia informação sobre a idade das cadelas na ficha clínica (Gráfico 1).

Tabela 2 – Número absoluto e frequência relativa de cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária durante o período de maio-2018 a agosto-2019 de acordo com a raça.

<b>Raça</b>	<b>Número de cadelas (n)</b>	<b>Frequência (%)</b>
SPRD*	35	70,00
Poodle	4	8,00
Labrador Retriever	2	4,00
Shih Tzu	2	4,00
Yorkshire Terrier	2	4,00
Boxer	1	2,00
Chihuahua	1	2,00
Dachshund	1	2,00
Pastor Alemão	1	2,00
Pinscher	1	2,00
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100,00</b>

\*SPRD = sem padrão racial definido. Fonte: do autor (2019).

Gráfico 1 – Número absoluto (n) de cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária durante o período de maio-2018 a agosto-2019, de acordo com a idade.



\*NI = não informado. Fonte: do autor (2019).

No que se referem aos tipos histológicos, as neoplasias malignas representaram 75,0% do total de amostras (57/76) e as benignas 25,0% (19/76). Dentre os tumores malignos, o carcinoma em tumor misto (CTM) foi o tipo mais comum, caracterizando 68,42% (39/57); e

em relação às neoplasias benignas o tumor misto benigno (TMB) representou 57,89% (11/19), sendo o tipo histológico mais comum (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Número absoluto (n) de amostras de neoplasias de mama de cadela no grupo maligno, diagnosticados no período de maio-2018 a agosto-2019.

<b>Diagnóstico morfológico</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Frequência (%)</b>
Carcinoma em tumor misto (CTM)	39	68,42
Carcinoma papilar	10	17,54
Carcinoma sólido	2	3,51
Carcinoma cribriforme	2	3,51
Carcinoma <i>in situ</i>	1	1,75
Carcinoma micropapilar	1	1,75
Adenomioepitelioma maligno*	1	1,75
Filodes maligno	1	1,75
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>100,0</b>

\* = imuno-histoquímica (IHQ) anti-p63 positiva. Fonte: do autor (2019).

Tabela 4 – Número absoluto (n) de amostras de neoplasias de mama de cadela no grupo benigno, diagnosticados no período de maio-2018 a agosto-2019.

<b>Diagnóstico morfológico</b>	<b>Amostras (n)</b>	<b>Frequência (%)</b>
Tumor misto benigno (TMB)	11	57,89
Papiloma	5	26,32
Adenoma	3	15,79
<b>TOTAL</b>	<b>19</b>	<b>100,00</b>

Fonte: do autor (2019).

Quanto à localização do tumor, as mamas inguinais e abdominais caudais foram as mais acometidas, sendo 35,53% (27/76) e 32,89% (25/76) respectivamente. As mamas abdominais craniais foram afetadas em 21,05% dos casos (16/76), torácicas caudais em 9,21% (7/76) e torácica cranial em 1,32% (1/76). No que se refere ao tamanho tumoral, 67,11% (51/76) dos tumores apresentaram menos de 3,0 cm de diâmetro (T1), 14,47% (11/76) entre 3,0-5,0 cm de diâmetro (T2) e 18,42% (14/76) eram maiores que 5,0 cm de diâmetro (T3). A tabela 5 caracteriza a distribuição e frequência dos tamanhos tumorais conforme os diferentes tipos histológicos.

Tabela 5 – Distribuição e frequência dos tamanhos das neoplasias mamárias de acordo com o tipo histológico.

TIPO HISTOLÓGICO	T1 – < 3cm		T2 – 3-5cm		T3 – > 5cm		Amostras n
	n	%	n	%	n	%	
CTM	23	59,0	7	18,0	9	23,1	39
Carcinoma papilar	8	80,0	1	10,0	1	10,0	10
Carcinoma sólido	0	0,0	1	50,0	1	50,0	2
Carcinoma cribriforme	2	100,0	0	0,0	0	0,0	2
Carcinoma <i>in situ</i>	0	0,0	1	100,0	0	0,0	1
Carcinoma micropapilar	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1
Adenomioepitelioma maligno	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1
Filodes maligno	0	0,0	0	0,0	1	100,0	1
TMB	10	90,9	1	9,1	0	0,0	11
Papiloma	5	100,0	0	0,0	0	0,0	5
Adenoma	3	100,0	0	0,0	0	0,0	3
<b>TOTAL</b>	51	-	11	-	14	-	76

\*CTM = carcinoma em tumor misto; TMB = tumor misto benigno. Fonte: do autor (2019).

Referente à análise de mastócitos, a densidade total ( $P < 0,001$ ) foi maior no grupo controle ( $P < 0,001$ ) quando comparado com os grupos maligno e benigno. A contagem diferencial de mastócitos granulados ( $P = 0,21$ ) e degranulados ( $P = 0,44$ ) foi semelhante entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 – Avaliação da densidade de mastócitos total, degranulado e granulado em mama normal (controle), neoplasias benignas e malignas (média  $\pm$  erro padrão).

	Controle (n=46)	Benigno (n=19)	Maligno (n=57)	P
MCD total	5,56 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	2,19 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	2,54 $\pm$ 0,27 <sup>b</sup>	<0,001
MCD degranulado total	2,71 $\pm$ 0,27	2,46 $\pm$ 0,67	2,58 $\pm$ 0,29	0,44
MCD granulado total	2,84 $\pm$ 0,25	1,99 $\pm$ 0,52	2,58 $\pm$ 0,28	0,21

MCD = densidade de mastócitos. Fonte: do autor (2020).

Não foi encontrada significância entre os grupos maligno e benigno quanto à microlocalização dos mastócitos degranulados ( $P = 0,56$ ). Entretanto, a densidade de



mastócitos granulados foi maior na região peritumoral no grupo maligno do que na região intratumoral dos grupos benigno e maligno ( $P=0,03$ ). Os dados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação da microlocalização de mastócitos granulados e degranulados nos grupos de neoplasias benignas e malignas (média  $\pm$  erro padrão).

GRUPO	Degranulado		P	Granulado		P
	Intratumoral	Peritumoral		Intratumoral	Peritumoral	
Benigno (n=19)	1,33 $\pm$ 0,44	1,12 $\pm$ 0,26	0,56	0,94 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	1,04 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	0,03
Maligno (n=57)	1,27 $\pm$ 0,21	1,31 $\pm$ 0,14		1,15 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	1,42 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	

Fonte: do autor (2020).

Foram avaliados 65 linfonodos, sendo 59 sem alterações, ou seja, sem metástase, e seis com metástases. No que se refere à avaliação dos linfonodos do grupo controle (sem alterações) e linfonodos metastáticos, não houve diferença entre os grupos quanto à densidade de mastócitos degranulados ( $P=0,76$ ), granulados ( $P=0,76$ ) e totais ( $P=0,48$ ); Tabela 8.

Tabela 8 – Média dos valores de mastócitos granulados e degranulados encontrados nos linfonodos do grupo controle e metastáticos de cadelas com neoplasia mamária (média  $\pm$  erro padrão).

	Controle n=59	Metástase n=6	P
Total	1,01 $\pm$ 0,16	2,37 $\pm$ 1,28	0,48
Degranulado	0,49 $\pm$ 0,08	1,58 $\pm$ 0,90	0,76
Granulado	0,54 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,39	0,76

Fonte: do autor (2020).

Na contagem total de vasos nas neoplasias primárias, as neoplasias malignas possuíam maior densidade vascular quando comparadas às neoplasias benignas (Maligno 5,32 $\pm$ 0,26 e Benigno 4,16 $\pm$ 0,41;  $P=0,042$ ). Entre os grupos maligno e benigno, quanto à localização dos vasos, havia maior densidade vascular peritumoral no grupo maligno do que no grupo benigno ( $P=0,02$ ). Porém, a densidade vascular intratumoral foi semelhante entre os grupos ( $P=0,17$ ; Tabela 9).

Tabela 9 – Avaliação da densidade vascular (peritumoral/intratumoral) nas neoplasias benignas e malignas (média ± erro padrão).

<b>GRUPO</b>	<b>Densidade vascular peritumoral</b>	<b>P</b>	<b>Densidade vascular intratumoral</b>	<b>P</b>
Benigno (n=19)	3,9±0,49	0,02	4,44±0,53	0,17
Maligno (n=57)	5,38±0,30		5,27±0,31	

Fonte: do autor (2020).

Na tabela 10, podem-se observar as correlações e valores de p. Houve correlação fraca e positiva entre os vasos intratumorais e mastócitos (total, degranulado peritumoral e intratumoral, granulado intratumoral e peritumoral, degranulado total e granulado total); vasos totais e mastócitos (total, granulado peritumoral e granulado total) e nenhuma correlação entre os vasos peritumorais e mastócitos.

Em relação à avaliação de fibrose, o grupo controle demonstrou maior área em relação aos grupos tumorais ( $P < 0,001$ ). Entre os grupos benigno e maligno não foi encontrada significância estatística ( $P > 0,05$ ; Tabela 11).

Tabela 10 – Correlações entre os vasos localizados na área intratumoral, peritumoral e total com os mastócitos (total, degranulado intratumoral e peritumoral, granulado intratumoral e peritumoral, granulado total e degranulado total).

Densidade Vascular Mastócito			INTRATUMORAL	PERITUMORAL	TOTAL
	TOTAL	<b>r</b>	0,342	0,124	0,225
	<b>P</b>	<b>0,0001</b>	0,289	<b>0,05</b>	
DEGR INTRA	<b>r</b>	0,260	0,083	0,152	
	<b>P</b>	<b>0,024</b>	0,478	0,192	
DEGR PERI	<b>r</b>	0,267	0,083	0,166	
	<b>P</b>	<b>0,021</b>	0,478	0,154	
GRAN INTRA	<b>r</b>	0,226	0,064	0,121	
	<b>P</b>	<b>0,05</b>	0,583	0,301	
GRAN PERI	<b>r</b>	0,322	0,186	0,256	
	<b>P</b>	<b>0,005</b>	0,110	<b>0,027</b>	
DEGR TOTAL	<b>r</b>	0,319	0,106	0,215	
	<b>P</b>	<b>0,005</b>	0,365	0,06	
GRAN TOTAL	<b>r</b>	0,359	0,181	0,259	
	<b>P</b>	<b>0,002</b>	0,121	<b>0,025</b>	

Fonte: do autor (2020). \*DEGRA (degranulado); INTRA (intratumoral); PERI (peritumoral); GRAN (granulado).

Tabela 11 – Avaliação da porcentagem de fibrose e tecido conjuntivo denso nos grupos de mama normal, de neoplasias benignas e neoplasias malignas (média ± erro padrão).

Grupos	Média (%)
Controle (n=46)	46,82±1,43 <sup>a</sup>
Grupo benigno (n=19)	31,51±2,25 <sup>b</sup>
Grupo maligno (n=57)	31,86±1,31 <sup>b</sup>

Letras diferentes diferem estatisticamente (P<0,0001). Fonte: do autor (2020).

O questionário obteve taxa de resposta de 72,0% (36/50). As respostas estão apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Respostas obtidas nos questionários aplicados.

Variáveis	n (%)
<b>CICLO ESTRAL (CIO)</b>	
Regular	18 (50,00)
Irregular – intervalo > 6 meses	3 (8,33)
Irregular – intervalo < 6 meses	1 (2,78)
Não sabe informar	14 (38,89)
<b>USO DE CONTRACEPTIVOS</b>	
Sim	7 (19,44)
Não	26 (72,22)
Não sabe informar	3 (8,33)
<b>PSEUDOCIESE (GRAVIDEZ PSICOLÓGICA)</b>	
Sim	9 (25,00)
Não	20 (55,56)
Não sabe informar	7 (19,44)
<b>GESTAÇÃO PRÉVIA</b>	
Sim	12 (33,33)
Não	23 (63,89)
Não sabe informar	1 (2,78)
<b>CASTRACÃO PRÉVIA AO SURGIMENTO DO TUMOR</b>	
Sim	7 (19,44)
Não	29 (80,56)
<b>MOTIVO DA CASTRAÇÃO</b>	
Concomitante a exérese tumoral	24 (66,67)
Preventiva	4 (11,11)
Não é castrada	4 (11,11)
Doença (piometra)	2 (5,56)
Outro	2 (5,56)
<b>INTERVALO PERCEPÇÃO DO TUMOR x ATENDIMENTO MÉDICO VETERINÁRIO</b>	
Dias ou Semanas (menos de 1 mês)	9 (25,00)
Menos de 3 meses	4 (11,11)
Entre 3-6 meses	4 (11,11)
6 meses a 1 ano	7 (19,44)
Mais de um ano	7 (19,44)
Não sei informar	5 (13,89)
<b>CONHECIMENTO PRÉVIO DA EXISTÊNCIA DE CÂNCER DE MAMA EM CADELAS</b>	
Sim	29 (80,56)
Não	7 (19,44)

## 8 DISCUSSÃO

No presente estudo, a contagem total de mastócitos não diferiu entre os grupos maligno e benigno, coincidindo com os achados de Lavallo et al. (2010). Entretanto, discordam de estudos prévios, que encontraram maior número de mastócitos em carcinomas mamários, lesões pré-neoplásicas e áreas invasoras, quando comparados com lesões hiperplásicas e glândula mamária normal de cadelas (IM et al., 2011; SFACTERIA et al., 2011). Fakhrjou et al. (2016) observaram maiores números de mastócitos com o aumento no grau de malignidade em carcinomas mamários de mulheres. Além disso, o número de mastócitos foi superior em lesões malignas do que em lesões benignas, sugerindo potencial papel dessas células em neoplasias malignas (KASHIWASE et al., 2004).

Também não houve significância na contagem diferencial total de mastócitos (granulados e degranulados) entre os grupos. Porém, este estudo é pioneiro na contagem diferencial de mastócitos em neoplasias mamárias de cadelas. Zaidi e Mallick (2014) encontraram maior densidade de mastócitos degranulados em casos de carcinoma de células escamosas (CCE) quando comparados com o grupo controle saudável. Poucos estudos foram direcionados para avaliar a importância da degranulação na progressão do câncer em humanos e cadelas. Por isso estudos com técnicas mais precisas para identificação de mastócitos e em maior número de casos, poderão trazer resultados de maior acurácia.

Com relação à microlocalização (peritumoral ou intratumoral) dos mastócitos degranulados não foi encontrada significância entre os grupos, em oposição aos achados em câncer de mama em mulheres. Mangia et al. (2011) encontraram mastócitos degranulados mais frequentes no tecido não tumoral e peritumoral. Também não foram encontrados estudos prévios que investigassem esse aspecto em neoplasias mamárias de cadelas. Na região peritumoral do grupo maligno foram encontrados mais mastócitos granulados quando comparado com a região intratumoral dos grupos maligno e benigno. Diferentemente do observado por Carpenco et al. (2019) que encontraram maior densidade de mastócitos na região intratumoral de tumores mais agressivos, servindo como fator prognóstico. Assim como observado por Keser et al. (2017) que correlacionaram positivamente parâmetros prognósticos como, por exemplo, invasão vascular e linfática com maior densidade de mastócitos intratumorais em carcinomas mamários.

Em relação à infiltração de mastócitos nos linfonodos, há uma dificuldade de encontrar dados na literatura sobre a densidade dessas células nesse órgão em condições de normalidade e em casos de metástases provocadas por neoplasias mamárias em cadelas. No

câncer de mama em mulheres foram encontrados mais mastócitos no linfonodo axilar sem alterações do que em linfonodos com metástase, significando que, quanto mais mastócitos, melhor o prognóstico (NAIK et al., 1997; JANA et al., 2017). Esse achado difere do presente estudo, que não encontrou maior mediana em linfonodos com metástase, entretanto o reduzido número de amostras pode justificar a falta de significância desta análise.

Quanto à angiogênese, os estudos realizados mostram a semelhança morfológica entre os vasos em neoplasias mamárias de cadelas e de mulheres, enfatizando o uso desses animais como modelo espontâneo (SLEECKX et al., 2011). Assim como observado no presente estudo, Restucci, De Vico e Maiolino (2000) também detectaram maior densidade de microvasos em neoplasias malignas de cadelas. Em outros tumores que acometem humanos, esta também foi uma observação comum. Como em neoplasias colorretais que exibem densidade microvascular superior em carcinomas quando comparados a adenomas, inferindo que a angiogênese acompanha o desenvolvimento tumoral (WONG et al., 1999). Ademais, as próprias células endoteliais também são capazes de estimular o crescimento neoplásico. Conseqüentemente, quanto mais vasos, mais células endoteliais, maior proliferação tumoral e maior risco de disseminação (RESTUCCI; DE VICO; MAIOLINO, 2000).

No que se refere à localização dos microvasos, os dados encontrados confirmam os achados de estudos anteriores realizados com neoplasias mamárias de cadelas, onde regiões peritumorais de neoplasias malignas possuíam mais vasos quando comparado com tumores benignos (GRAHAM; MYERS, 1999; SLEECKX et al., 2014). A angiogênese aferida pela densidade de microvasos em neoplasias mamárias de cadelas é considerada um indicador de malignidade, assim como observado para o câncer de mama em mulheres (NARITA et al., 1998; LAVALLE et al., 2009). Estudos adicionais que possam avaliar a densidade de microvasos, associando ao intervalo livre de doença e tempo de sobrevida são imprescindíveis para consolidar essa afirmativa no presente estudo.

A correlação entre vasos e mastócitos no presente estudo foi semelhante aos achados de Im et al. (2011), que encontraram correlação entre densidade de mastócitos e densidade de vasos sanguíneos em carcinoma mamário de cadelas. Entretanto, as técnicas utilizadas neste estudo para evidenciação dos mastócitos foi de imunohistoquímica anti-triptase e azul de toluidina. A imunomarcação mostrou correlação superior quando comparada com a técnica histoquímica, sugerindo a triptase como um estimulador potente da angiogênese. Esse achado também foi encontrado em estudo de mulheres com câncer de mama, em que houve correlação entre mastócitos positivos para triptase e densidade microvascular (RANIERI et al., 2009). Em Medicina, diferentes tipos de neoplasias foram pesquisados e obtiveram

correlação entre mastócitos e densidade de microvasos como tumores pulmonares, câncer endometrial e CCE oral (TOMITA; MATSUZAKI; ONITSUKA, 2000; RIBATTI et al., 2005; MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2008). Zaidi e Mallick (2014) verificaram que os mastócitos associados ao tumor liberam componentes granulares que potencializam a angiogênese.

Com relação à área de fibrose e tecido conjuntivo denso, o grupo controle obteve média superior, uma vez que o tecido mamário normal possui maior deposição de colágeno quando comparado com tecidos neoplásicos. A anatomia da glândula mamária normal é semelhante entre cadelas e mulheres (MARKKANEN, 2019). O estroma mamário é altamente fibroso quando comparado a outras espécies (HASSIOTOU; GEDDES, 2014). Entretanto, assim como foi observado por Toledo et al. (2018), não houve significância estatística entre os grupos de neoplasias benignas e malignas. Diferentemente de outros estudos que encontraram a porcentagem de fibrose como um fator prognóstico independente em neoplasias mamárias de mulheres e cadelas, sendo observadas maiores porcentagens de tecido fibroso em neoplasias mais agressivas, com menor tempo de recorrência e sobrevida (DE KRUIJF et al., 2011; DEKKER et al., 2013; GUJAM et al., 2014; MOORMAN et al., 2012; DE SOUZA et al., 2018). O número reduzido de amostras associado à heterogeneidade das neoplasias mamárias em cadelas podem ter dificultado a interpretação dos resultados obtidos.

A maioria das cadelas foi castrada após o diagnóstico de neoplasia mamária e a cirurgia de ovariosalpingohisterectomia foi realizada concomitantemente à exérese do tumor. Entretanto, a idade das cadelas à castração não foi informada, uma vez que muitos tutores não sabiam fornecer esta informação. Esses achados confirmam a importância da castração precoce com caráter preventivo, uma vez que a exposição prolongada do epitélio da glândula mamária a hormônios sexuais é conhecida como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do tumor de mama em cadelas (NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017).

As neoplasias não mamárias foram diagnosticadas clinicamente como neoplasias de glândula mamária, demonstrando falha na escolha de métodos adequados para o diagnóstico. A CAAF já foi demonstrada como método eficaz no diagnóstico de neoplasias mamárias caninas, correlacionada ao exame histopatológico. Cassali et al. (2007) e Simon et al. (2009) encontraram, respectivamente, sensibilidade de 88,6% e 88% e especificidade de 100% e 96% para o diagnóstico de lesões mamárias malignas. Além disso, a CAAF é um método de triagem de fácil execução, rápido, não invasivo e não oneroso. A técnica fornece diagnóstico diferencial para lesões inflamatórias, não neoplásicas e neoplásicas (PAVEL; MALANCUS;

CONDREA, 2016), reduzindo possíveis erros diagnósticos, que minimizarão as chances de sub ou supertratamentos.

No que se refere à idade, os resultados obtidos são similares aos dados encontrados na literatura que apontam as cadelas de meia idade e idosas como sendo mais suscetíveis (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). Observando a distribuição racial, a maior frequência de cadelas acometidas serem SPRD pode estar associada ao fato destes animais representarem a maior parte da população atendida nas clínicas e hospitais veterinários, bem como nos exames encaminhados ao Setor de Patologia Veterinária (SPV-UFLA). Porém, a predisposição racial ainda não está totalmente elucidada na literatura. Sorenmo (2003) evidenciou que o risco de desenvolvimento de câncer de mama de acordo com as raças, varia com o estudo e a localização geográfica.

A maior frequência de tumores malignos observada (75,0%), foi semelhante ao estudo de Oliveira Filho et al. (2010), onde as neoplasias malignas representaram 73,4% do total de diagnósticos de tumores de mama. Entretanto, Toríbio et al. (2012) encontraram frequência de 90,9% de neoplasias mamárias malignas no Nordeste do país. Quando comparadas com relatos da literatura estrangeira, as neoplasias mamárias malignas em cadelas possuem frequências bem menores, como o estudo de Sorenmo et al. (2009) que diagnosticou apenas 15,7% (37/236) de neoplasias malignas. Essa diferença deve-se ao fato de que no Brasil o tempo entre a identificação do tumor e a procura por auxílio veterinário é prolongado. A demora pode favorecer a progressão de tumores benignos para malignos (SORENMO et al., 2009).

Os dados sobre a localização tumoral apoiam-se nos achados da literatura, que descrevem os dois últimos pares de mamas, ou seja, abdominal caudal e inguinal como as mais acometidas. Provavelmente essas glândulas respondem de forma mais ativa ao estímulo hormonal, devido à maior quantidade de tecido parenquimatoso (SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013; CASSALI et al., 2014). Quanto ao tamanho tumoral, foi observada maior frequência de tumores inferiores a 3,0 cm, tanto malignos quanto benignos. Entretanto, todos os tumores maiores que 5,0 cm receberam diagnóstico de neoplasia maligna, com prognóstico desfavorável, como o carcinoma micropapilar e o carcinoma sólido. Lesões de tamanho superior a 5,0 cm estão comumente associadas à malignidade, prognósticos piores, maior índice de proliferação celular, menor expressão de receptores hormonal e consequentemente, menor sobrevida (FERREIRA et al., 2009).



## **9 CONCLUSÃO**

Os resultados desse estudo demonstraram que uma maior densidade de mastócitos está relacionada à maior densidade de vasos sanguíneos e que estes são mais abundantes em neoplasias malignas reforçando o papel crucial da angiogênese no desenvolvimento neoplásico. A angiogênese é um potente alvo de terapias antitumorais, porém estudos complementares com maior número de casos envolvendo técnicas mais precisas como a imunohistoquímica e associando com fatores clínicos são imprescindíveis para proporcionar suporte adicional às descobertas presentes.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8195-8205, 2018.
- ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. São Paulo, 2018. **População de animais no Brasil**. Disponível em: <<http://institutopetbrasil.com/>>. Acesso em: 09 out. 2019.
- ARAÚJO, M. 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, 2015.
- BESERRA, H. E. O. et al. Metastasis of mammary carcinoma in bitches: evaluation of the sentinel lymph node technique. **Advances in Breast Cancer Research**, v. 5, n. 02, p. 58-65, 2016.
- CAJA, L. et al. TGF- $\beta$  and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1-24, 2018.
- CARPENCO, E. et al. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. **In Vivo**, v. 33, n. 3, p. 743-748, 2019.
- CASSALI, G. et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v. 18, n. 3, p. 191-196, 2007.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors-2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.
- CH'NG, S. et al. Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern Pathology**, v. 19, n. 1, p. 149-159, 2006.
- CHANDLER, C. et al. The double edge sword of fibrosis in cancer. **Translational Research**, v. 209, p. 55-67, 2019.
- CHANG, S.-C. et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998–2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 10, p. 1625-1629, 2005.
- CRIVELLATO, E.; NICO, B.; RIBATTI, D. Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 269, n. 1, p. 1-6, 2008.
- DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698-738, 2014.
- DABIRI, S. et al. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. **Modern Pathology**, v. 17, n. 6, p. 690-695, 2004.

DE KRUIJF, E. M. et al. Tumor–stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 687-696, 2011.

DE SOUZA, T. A. et al. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 209-214, 2018.

DEKKER, T. et al. Prognostic significance of the tumor-stroma ratio: validation study in node-negative premenopausal breast cancer patients from the EORTC perioperative chemotherapy (POP) trial (10854). **Breast cancer research and treatment**, v. 139, n. 2, p. 371-379, 2013.

DELLA ROVERE, F. et al. Mast cells in invasive ductal breast cancer: different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. **Anticancer Research**, v. 27, n. 4B, p. 2465-2471, 2007.

DVORAK, A. M. et al. Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. **Blood**, v. 83, n. 12, p. 3600-3612, 1994.

DYDUCH, G.; KACZMARCZYK, K.; OKOŃ, K. Mast cells and cancer: enemies or allies? **Polish Journal of Pathology**, v. 63, n. 1, p. 1-7, 2012.

ELPEK, G. Ö. et al. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 12, p. 940-944, 2001.

FAKHRJOU, A. et al. The relationship between histologic grades of invasive carcinoma of breast ducts and mast cell infiltration. **South Asian Journal of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 5-7, 2016.

FERREIRA, E. et al. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 105-109, 2003.

FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 4, p. 230-235, 2009.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FUENTES, I. M. et al. Assessment of perigenital sensitivity and prostatic mast cell activation in a mouse model of neonatal maternal separation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, v. n. 102, p. 1-8, 2015.

GARDNER, H. L.; FENGER, J. M.; LONDON, C. A. Dogs as a Model for Cancer. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 199-222, 2016.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRAHAM, J. C.; MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 416-418, 1999.

GUJAM, F. et al. The relationship between the tumour stroma percentage, clinicopathological characteristics and outcome in patients with operable ductal breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 1, p. 157-165, 2014.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clinical Anatomy**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2013.

HIROMATSU, Y.; TODA, S. Mast cells and angiogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 1, p. 64-69, 2003.

IM, K.-S. et al. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in canine mammary carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2-3, p. 157-163, 2011.

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <  
[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a\\_situacao\\_ca\\_mama\\_brasil\\_2019.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//a_situacao_ca_mama_brasil_2019.pdf)>. Acesso em: 09 out. 2019.

JANA, S. et al. Quantitative analysis and comparison of mast cells in breast carcinomas and axillary lymph nodes. **Clinical Cancer Investigation Journal**, v. 6, n. 5, p. 214, 2017.

JOHANSSON, A. et al. Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. **American Journal of Pathology**, v. 177, n. 2, p. 1031-1041, 2010.

KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 9, p. 582-598, 2016.

KASHIWASE, Y. et al. Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant breast lesions. **International archives of allergy and immunology**, v. 134, n. 3, p. 199-205, 2004.

KESER, S. H. et al. Relationship of mast cell density with lymphangiogenesis and prognostic parameters in breast carcinoma. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 33, n. 4, p. 171-180, 2017.

KRYSTEL-WHITTEMORE, M.; DILEEPAN, K. N.; WOOD, J. G. Mast cell: a multi-functional master cell. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1-12, 2016.

LAVALLE, G. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, 2009.

LAVALLE, G. et al. Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1348-1351, 2010.

- LEBLEU, V. S.; KALLURI, R. A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 4, p. 1-9, 2018.
- LIU, D. et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 18, p. 5045-5056, 2014.
- MANGIA, A. et al. Tissue remodelling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1096-1106, 2011.
- MARKKANEN, E. Know Thy Model: Charting Molecular Homology in Stromal Reprogramming Between Canine and Human Mammary Tumors. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, 2019.
- MAURO, L. V. et al. Association between mast cells of different phenotypes and angiogenesis in colorectal cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 1, n. 6, p. 895-902, 2008.
- MERLO, D. F. et al. Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 976-984, 2008.
- MICHAILIDOU, E.; MARKOPOULOS, A.; ANTONIADES, D. Mast cells and angiogenesis in oral malignant and premalignant lesions. **The open dentistry journal**, v. 2, p. 126, 2008.
- MITTAL, S.; BROWN, N. J.; HOLEN, I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 3, p. 227-243, 2018.
- MOORMAN, A. et al. The prognostic value of tumour-stroma ratio in triple-negative breast cancer. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 38, n. 4, p. 307-313, 2012.
- MUKARATIRWA, S. et al. Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. **Veterinary Dermatology**, v.17, n.2, p.141-146, 2006a.
- MUKARATIRWA, S. et al. Canine transmissible venereal tumour: assessment of mast cell numbers as indicators of the growth phase. **Veterinary Research Communications**, v.30, n. 6, p. 613-621, 2006b.
- NAIK, R. et al. Distribution of mast cells in the axillary lymph nodes of breast cancer patients. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 95, n. 12, p. 606-607, 1997.
- NARITA, M. et al. Independent prognostic factors in breast cancer patients. **The American journal of surgery**, v. 175, n. 1, p. 73-75, 1998.
- NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias caninas. In: CASSALI, G. D. Patologia Mamária Canina: do diagnóstico ao tratamento. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2017. cap.3, p. 27-31.
- NUNES, F. 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.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

PARK, J. et al. The relationship between tumour stroma percentage, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 3, p. 644-651, 2014.

PASTOR, N. et al. Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 50, n. 3, p. 143-147, 2018.

PAVEL, G.; MALANCUS, R. N.; CONDREA, M. Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) of Neoplasms in Dogs and Cats, with Emphasis on Differential Diagnosis-A Retrospective Study. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 116-126, 2016.

PRIER, J.; BRODEY, R. Canine neoplasia: a prototype for human cancer study. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, n. 3, p. 331-334, 1963.

QUEIROGA, F. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 1-3, p. 181-187, 2005.

RANIERI, G. et al. Tryptase-positive mast cells correlate with angiogenesis in early breast cancer patients. **International journal of oncology**, v. 35, n. 1, p. 115-120, 2009.

RESTUCCI, B.; DE VICO, G.; MAIOLINO, P. Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 4, p. 297-301, 2000.

RIBATTI, D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. **Immunology Letters**, v. 152, n. 2, p. 83-88, 2013.

RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 1, p. 2-8, 2012.

RIBATTI, D. et al. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 5, p. 420-425, 2003.

RIBATTI, D. et al. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial cancer. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, n. 6, p. 1961-1965, 2005.

RIBATTI, D. et al. The structure of the vascular network of tumors. **Cancer Letters**, v. 248, n. 1, p. 18-23, 2007.

RIGONI, A.; COLOMBO, M.; PUCILLO, C. The role of mast cells in molding the tumor microenvironment. **Cancer Microenvironment**, v. 8, n. 3, p. 167-176, 2015.

ROY, A.; BERA, S. CAF cellular glycolysis: linking cancer cells with the microenvironment. **Tumor Biology**, v. 37, n. 7, p. 8503-8514, 2016.

RUSSO, R. C. et al. Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 269-282, 2011.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249-1261, 1969.

SFACTERIA, A. et al. Mast cells in canine mammary gland tumour: number, distribution and EPOR positivity. **Veterinary and comparative oncology**, v. 9, n. 4, p. 310-315, 2011.

SIMON, D. et al. Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 521-528, 2009.

SLEECKX, N. et al. Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, 2011.

SLEECKX, N. et al. Angiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. **Journal of comparative pathology**, v. 150, n. 2-3, p. 175-183, 2014.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2013. cap. 27, p. 538-556.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3-4, p. 142-152, 2015.

THEOHARIDES, T. C. et al. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. **Immunological Reviews**, v. 217, n. 1, p. 65-78, 2007.

TOLEDO, G. N. et al. Tissue fibrosis and its correlation with malignancy in canine mammary tumors. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 31, n. 4, p. 295-303, 2018.

TOMITA, M.; MATSUZAKI, Y.; ONITSUKA, T. Effect of mast cells on tumor angiogenesis in lung cancer. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 69, n. 6, p. 1686-1690, 2000.

TORÍBIO, J. M. M. L. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427-433, 2012.

UZZAN, B. et al. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 2941-2955, 2004.

VASCELLARI, M. et al. Incidence of mammary tumors in the canine population living in the Veneto region (Northeastern Italy): Risk factors and similarities to human breast cancer. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 126, p. 183-189, 2016.

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. **Blood**, v. 111, n. 6, p. 3070-3080, 2008.

WANG, K. et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 7, n. 9, p. 1457-1461, 2012.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why worry about cancer in companion animals?. In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2013. p. XV-XVI.



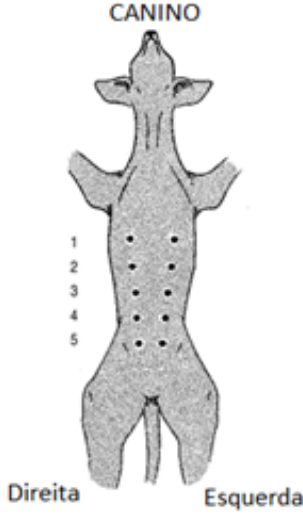
WOLDEMESKEL, M.; RAJEEV, S. Mast cells in canine cutaneous hemangioma, hemangiosarcoma and mammary tumors. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 2, p. 153-160, 2010.

WONG, M. P. et al. Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. **International journal of cancer**, v. 81, n. 6, p. 845-850, 1999.

ZAIDI, M.; MALLICK, A. A study on assessment of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **Annals of medical and health sciences research**, v. 4, n. 3, p. 457-460, 2014.



ANEXO A – Ficha entregue aos médicos veterinários participantes do projeto.

FICHA DE ENVIO DE MATERIAL PARA O PROJETO DE MESTRADO – <b>Fernanda Rezende Souza</b> É imprescindível o preenchimento dessa ficha para que o material participe do projeto	
 <h2 style="margin: 0;">NOME DO ESTABELECIMENTO</h2> 	
DADOS DO TUTOR	DADOS DO PACIENTE
Nome:	Nome:
	Espécie: ( ) Canina ( ) Felina
Telefone:	Idade:                      Raça:
	Castrada: ( ) Sim ( ) Não
DADOS DO MATERIAL	
Data da coleta:	
( ) Nodulesctomia – remoção do(s) nódulo(s) encontrado(s)	
( ) Mastectomia simples – remoção da glândula mamária acometida	
( ) Mastectomia regional – remoção de duas ou mais glândulas mamárias	
( ) Mastectomia unilateral – remoção de todas as glândulas mamárias (ipsilateral)	
( ) Mastectomia bilateral – remoção de todas as glândulas mamárias (esquerda e direita)	
<p>DESENHAR NO MODELO QUAL/QUAIS MAMAS FORAM RETIRADAS</p> <p style="margin: 0;">CANINO</p>  <p style="margin: 0;">Direita                      Esquerda</p>	
REMOÇÃO DE LINFONODOREGIONAL: ( ) Sim ( ) Não	
EXAMES COMPLEMENTARES	
Imagem (raio-x, ultrassom): ( ) Sim ( ) Não	
Hemograma: ( ) Sim ( ) Não	
Bioquímico: ( ) Sim ( ) Não	
Observações:	
<p>Em caso de dúvidas por gentileza entrar em contato (35) 99186-4942 OI ou (35) 99242-4942 TIM</p> <p><b>O preenchimento da ficha é essencial para o sucesso da pesquisa! Obrigada pela compreensão.</b></p>	

Fonte: do autor (2018).