

THAÍS VAN DEN BROEK CAMPANELLI

Modelos de matriz extracelular de carcinoma mamário canino

São Paulo

2023

THAÍS VAN DEN BROEK CAMPANELLI

Modelos de matriz extracelular de carcinoma mamário canino
VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para Obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4291
FMVZ

Campanelli, Thaís van den Broek
Modelos de Matriz Extracelular de Carcinoma Mamário Canino / Thaís van den
Broek Campanelli. – 2023.
111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Neoplasia mamária. 2. Oncologia. 3. Descelularização. 4. Microambiente tumoral.
5. Cão. I. Título.

Certificado Comissão de Ética



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 11th October 2022

CERTIFIED

We certify that the Research "MODELS OF EXTRACELLULAR MATRIX IN CANINE BREAST CARCINOMA", protocol number CEUAX 3966081220 (ID 001854), under the responsibility Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day June 17, 2021.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "MODELOS DE MATRIZ EXTRACELULAR DE CARCINOMA MAMÁRIO CANINO", protocolado sob o CEUAX nº 3966081220, sob a responsabilidade de Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 17 de junho de 2021.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CAMPANELLI, Thaís van den Broek

Título: **Modelos de matriz extracelular de carcinoma mamário canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Cecília, que me apoiou para que fosse possível a realização de mais um projeto na minha vida, que nunca mediu esforços e sempre deu todo o suporte necessário para eu seguir meu caminho e realizar meus sonhos.

À professora Maria Angélica Miglino, por me orientar na realização deste projeto, e proporcionar uma experiência única dentro da Universidade de São Paulo e no ramo acadêmico. Após a conclusão deste mestrado e suas orientações neste período me sinto mais preparada para enfrentar novos desafios no mercado de trabalho. Sou muito grata a senhora por ter me mostrado uma nova área dentro da medicina veterinária e a importância da pesquisa.

Ao Dr. Adriano Dall'Olio, que sempre me incentivou e me inspirou a buscar novos conhecimentos e ter uma visão além da clínica médica, sempre mostrando a possibilidade de novos caminhos e inovações na medicina veterinária. A professora Ana Claudia Carreira que me apoiou durante todo o período de mestrado e me auxiliou na interpretação dos resultados e na realização do processo de descelularização.

Em especial as colegas de doutorado Thamires Santos da Silva e Bruna Tássia Pantoja, e de mestrado Lívia Barbosa de Andrade do Departamento de Cirurgia FMVZ-USP que tiveram paciência em transmitir seus conhecimentos já adquiridos e me deram suporte durante esta jornada, além de auxiliarem na realização de todos os procedimentos e análises do meu projeto.

Ao Dr. Luiz Augusto Santana Silva e toda a equipe do laboratório PathoDxVet, que classificaram as neoplasias mamárias utilizadas neste projeto e se colocaram a disposição para quaisquer dúvidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

CAMPANELLI, T.V.D.B. **Modelos de matriz extracelular de carcinoma mamário canino**. 2023. 111 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Os tumores mamários representam grande parte dos diagnósticos em fêmeas caninas, e são considerados a principal causa de óbitos em relação aos pacientes oncológicos em cães. As neoplasias malignas, assim o carcinoma mamário, correspondem mais da metade dos casos, e comumente apresentam alta capacidade de metástase, rápida evolução e crescimento invasivo. A matriz extracelular (MEC) do tecido mamário contempla um microambiente dinâmico de componentes proteicos, cuja sua função vai além de atuar como um arcabouço estrutural, sendo importantes para a regulação de funções celulares, as quais influenciam na progressão e comportamento biológico do câncer. Além disso, a MEC pode servir como uma barreira física que interfere na ação de terapias contra o câncer de mama. Diante disso, este estudo visou identificar alterações nos componentes e estrutura da MEC em diferentes classificações de neoplasias mamárias que acometem a espécie canina, tendo como comparação a glândula mamária sadia. Foram realizadas análises em 10 amostras distintas de tumores de mama e em 1 glândula mamária sadia, e foi adotado o processo de descclularização a fim de visualizar somente a MEC dos tecidos. Realizou-se análises histológicas, marcação com DAPI, microscopia eletrônica de varredura e imuno-histoquímica. Os resultados revelaram maior preservação dos componentes e estrutura da MEC com o uso do detergente Triton X-100 1% no processo de descclularização. Observou-se menor quantidade de fibras colágenas na região intratumoral, podendo ser relacionada com maiores graus histológicos, além de colágenos mais unidos e alinhados nos tumores mamários, comparado a glândula mamária sadia, a qual apresentou fibras mais esparsadas e finas no tecido. A marcação de MMP-9 foi observada em tumores com maiores graus histológicos e foi associada a degradação de colágeno III e elastina na matriz. O processo de descclularização se mostrou valioso para avaliação focada nos componentes da MEC e na sua remodelação na ocorrência de tumores mamários caninos. Sendo assim, as alterações que ocorrem com a MEC, evidenciadas neste estudo, podem fornecer pistas importantes para a pesquisa e desenvolvimento de novas terapias focadas no microambiente tumoral e seus componentes.

Palavras-chave: neoplasia mamária, oncologia, descclularização, microambiente tumoral, cão.

ABSTRACT

CAMPANELLI, T.V.D.B. **Modelos de matriz extracelular de carcinoma mamário canino.** 2023. 111 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Mammary tumors are frequently diagnosed in canine females, and are considered the main cause of death when it refers to oncological dog patients. Malignant neoplasms, such as mammary carcinoma, correspond to more than half of the diagnoses, and commonly have a high capacity for metastasis, rapid evolution, and invasive growth. The mammary extracellular matrix (ECM) is a dynamic microenvironment of protein components, whose function goes beyond acting as a structural framework, being an important regulator of cellular functions. These characteristics will influence the cancer progression and biological behavior, in addition to act as a physical barrier that interferes in the efficacy of mammary tumors therapies. Therefore, this study aimed to identify changes in the components and structure of ECM in different classifications of mammary neoplasms that affect the canine species, having as comparison the healthy mammary gland. Analyses were performed in 10 distinct samples of mammary tumors and in 1 healthy mammary gland, and the decellularization process was adopted in order to visualize only the ECM of the tissues. For this, histological analysis, DAPI staining, scanning electron microscopy and immunohistochemistry were performed. The results revealed greater preservation of the components and structure of the ECM with the use of the detergent Triton X-100 1% in the decellularization process. It was observed a lower amount of collagen fibers in the intratumoral region, which may be related to higher histological degrees, as well as more united and aligned collagen in canine mammary tumors, when compared to the healthy mammary gland that showed more sparse and thinner fibres in the tissue. The positive expression of MMP-9 was observed in tumors with higher histological degrees and was associated with collagen III and elastin degradation in the matrix. The decellularization process proved to be valuable for an evaluation focused on the components of ECM and its remodeling in the occurrence of cancer. In that case, the changes that occur with ECM, evidenced in this study, can provide important clues for the research and development of new therapies focused on the constituents of ECM.

Keywords: mammary neoplasm, oncology, decellularization, tumor microenvironment, mammary gland, dog.

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurônico
CTMs	Células Troncos Mesenquimais
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAGs	Glicosaminoglicanos
H&E	Hematoxilina e eosina
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMP	Metaloproteinases
OCT	Tissue Teck O.C.T
PBS	Solução salina tamponada fosfatada
SDC	Desoxicolato de Sódio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SRD	Sem raça definida

LISTA DE FIGURAS

Revisão De Literatura

- Figura 1** – Vista ventral das glândulas mamárias caninas, evidenciando os vasos sanguíneos e os linfonodos. 1- Linfonodos axilar e axilar acessório; 2 – Ramo da artéria torácica lateral; 3- Ramo de vasos torácicos internos; 4- Ramificações dos vasos epigástricos craniais superficiais; 5- Artéria epigástrica caudal superficial; 6- Linfonodos inguinais superficiais; 7- Ramo labial ventral para a vulva; 8- Artéria pudenda externa. Dyce, Sack e Wensing (2010)21
- Figura 2** – Fotomicrografia da glândula mamária sadia da espécie canina, evidenciando os alvéolos, ductos e o estroma que compõe o tecido. Coloração de H&E, escala de 100 µm.....22
- Figura 3** – Representação esquemática da estrutura da glândula mamária sadia e componentes que constituem a matriz extracelular deste tecido..... 33
- Figura 4** – Desenho esquemático das alterações da MEC durante a progressão do câncer de mama. Adaptado de Insua-rodríguez e Oskarsson (2016)..... 39

CAPÍTULO I: Comparação De Protocolos De Descelularização Em Tecido Mamário Sadio E Acometido Com Neoplasia Mamária Na Espécie Canina

- Figura 1** – Resumo esquemático da coleta das amostras de tecido mamário sadio e neoplásico, seguida da forma de armazenamento das amostras e análises realizadas..... 44
- Figura 2** – Desenho esquemático do local de coleta de amostras dos fragmentos de neoplasias mamárias..... 44
- Figura 3** – Desenho esquemático do processo de descelularização dos tecidos mamários neoplásico e sadio, evidenciando as etapas realizadas após a divisão do tumor em 4 fragmentos..... 46
- Figura 4** – Fragmentos de tecido mamário sadio nativo e descelularizado. A- Glândula mamária (tecido nativo); B – Fragmento descelularizado com o detergente Triton X-100 1% (Protocolo A); C - Fragmento descelularizado com o detergente SDS 0,5%

(Protocolo B); D - Fragmento descelularizado com o detergente SDC 4% (Protocolo C); E - Fragmento descelularizado com o detergente SDS 0,5% e Triton X-100 1% (Protocolo D) 48

Figura 5 – Análises histológicas da glândula mamária sadia canina, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado nos 4 protocolos utilizados. As imagens mostram uma matriz preservada com o uso do Triton X-100 1% (A), enquanto no SDS 0,5% (B) observa-se a degradação da MEC (estrelas), no uso do SDC 4% (C) há uma descelularização incompleta com presença de componentes celulares (setas) e leve degradação da matriz (estrelas), e já a associação de SDS 0,5% e Triton X-100 1% (D) mostrou uma boa preservação da MEC. Coloração H&E, Tricômio de Gômori, Alcian Blue e DAPI, escala de 100 µm..... 49

Figura 6 – Fragmentos de tecido mamário neoplásico nativo, anterior ao processo de descelularização. A – Fragmento neoplásico referente ao Animal 1; B - Fragmento neoplásico referente ao Animal 2; C - Fragmento neoplásico referente ao Animal 3; D - Fragmento neoplásico referente ao Animal 4 contendo centros de calcificação (setas)..... 50

Figura 7 – Fragmentos de tecido mamário neoplásico após o processo de descelularização, comparando os diferentes tipos neoplásicos diagnosticados nos animais 1, 2, 3 e 4 com os protocolos Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D) utilizados no processo de descelularização... 51

Figura 8 – Cortes histológicos de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração H&E, escala de 100 µm..... 52

Figura 9 – Fotomicrografia de lâmina histológica de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração Tricômio de Gomori, escala de 100 µm..... 53

Figura 10 – Fotomicrografia de lâmina histológica de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração Alcian Blue, escala de 100 µm. 54

Figura 11 – Marcação de núcleos celulares por meio da técnica de fluorescência 4',6'-diamino-2-fenil-indol nos tecidos neoplásicos nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). DAPI, 100 µm..... 55

CAPÍTULO II: Caracterização Da Matriz Extracelular De Glândula Mamária Sadia E Tumores Mamários Caninos

Figura 1 – Resumo esquemático da coleta das amostras de tecido mamário sadio e neoplásico, seguida da forma de armazenamento das amostras e análises realizadas..... 63

Figura 2 – Desenho esquemático de local de coleta de amostras dos fragmentos de tumores mamários da espécie canina 63

Figura 3 – Análises histológicas com as colorações de H&E, Tricomio de Gomori, Alcian Blue e Picrossírus red, evidenciando o tecido mamário sadio nativo e descelularizado 67

Figura 4 – Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a estrutura e organização do tecido mamário sadio nativo e descelularizado..... 68

Figura 5 – Análise de imuno-histoquímica da glândula mamária sadia com expressão positiva de elastina e colágeno tipo III (nativo e descelularizado), e leve expressão de MMP-9 no tecido nativo, e expressão negativa no tecido descelularizado..... 70

Figura 6 – Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido

descelularizado. Coloração H&E, escala de 100 μm 72

Figura 7 – Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Tricômio de Gomori, escala de 100 μm 74

Figura 8 – Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Picrossírus red, escala de 100 μm76

Figura 9 – Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Alcian Blue, escala de 100 μm 79

Figura 10 – Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado..... 82

Figura 11 – Imuno-histoquímica com expressão de colágeno tipo III em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado..... 83

Figura 12 – Imuno-histoquímica com expressão de elastina em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado..... 84

Figura 13 – Imuno-histoquímica com expressão de MMP-9 em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado..... 85

LISTA DE TABELAS

Revisão De Literatura

Tabela 1 - Classificação de neoplasias mamárias caninas proposta por Goldsmith et al. (2011)25

Tabela 2 - Estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM. Cassali et al. (2020)26

CAPÍTULO I: Comparação Dos Protocolos De Descelularização Em Tecido Mamário Sadio E Acometido Com Neoplasia Mamária Na Espécie Canina

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo associados ao diagnóstico histopatológico..... 47

CAPÍTULO II: Caracterização Da Matriz Extracelular De Glândula Mamária Sadia E Tumores Mamários Caninos

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo associados ao diagnóstico histopatológico..... 66

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I: Comparação Dos Protocolos De Descelularização Em Tecido Mamário Sadio E Acometido Com Neoplasia Mamária Na Espécie Canina

Gráfico 1 - Gráfico revelando a quantificação de GAGs presentes no tecido mamário neoplásico nativo e descelularizado, comparando os diferentes protocolos realizados41..

Gráfico 2 – Gráfico revelando a quantificação de DNA das amostras de tecido mamário sadio e tecido mamário neoplásico referentes aos protocolos A e D.
..... 56

CAPÍTULO II: Caracterização Da Matriz Extracelular De Glândula Mamária Sadia E Tumores Mamários Caninos

Gráfico 1 - Gráfico indicando a presença de glicosaminoglicanos no tecido mamário sadio nativo e descelularizado.
..... 68

Gráfico 2 – Gráfico indicando a presença de colágenos totais no tecido mamário sadio nativo e descelularizado..... 69

Gráfico 3 – Gráfico representando a quantificação de colágenos totais das neoplasias mamárias dos animais 1 a 10..... 77

Gráfico 4 – Gráfico representando a quantificação de glicosaminoglicanos das neoplasias mamárias dos animais 1 a 10.
..... 80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Anatomia, desenvolvimento e histologia da glândula mamária	20
2.2 Neoplasias mamárias caninas	23
2.3 Arquitetura e componentes da Matriz Extracelular	29
2.3.1 Alterações da Matriz Extracelular nas neoplasias mamárias	34
2.4 A Matriz Extracelular como resistência a terapias no câncer	39
3. CONCLUSÃO	40

CAPÍTULO I: Comparação Dos Protocolos De Descelularização Em Tecido Mamário Sadio E Acometido Com Neoplasia Mamária Na Espécie Canina

1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Aprovação no Comitê de Ética	43
2.2 Coleta de amostras	43
2.3 Análise histopatológica	44
2.4 Protocolos de descelularização	45
2.5 Técnica de Fluorescência 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI)	46
2.6 Quantificação de GAGs	46
3. RESULTADOS	47
3.1 Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes incluídos no estudo	47
3.2 Comparação dos protocolos de descelularização	47
3.2.1 Análise macroscópica da glândula mamária sadia	47
3.2.2 Análise microscópica da glândula mamária sadia.....	48
3.2.3 Análise macroscópica de tumores mamários caninos	49

3.2.4	Análise microscópica de tumores mamários caninos.....	51
3.2.5	DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol)	54
3.2.6	Quantificação de GAGs	55
4.	DISCUSSÃO	56
5.	CONCLUSÃO	59

CAPÍTULO II: Caracterização Da Matriz Extracelular De Glândula Mamária Sadia E Tumores Mamários Caninos

1.	INTRODUÇÃO	60
2.	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1	Aprovação no Comitê de Ética	62
2.2	Coleta de amostras	62
2.3	Análise histopatológica	63
2.4	Processo de descelularização	64
2.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
2.6	Quantificação de GAGs e colágenos	64
2.7	Imuno-histoquímica	65
3.	RESULTADOS	65
3.1	Caracterização da Matriz Extracelular da glândula mamária sadia	67
3.1.1	Análises histológicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67
3.1.2	Quantificação de Glicosaminoglicanos totais	68
3.1.3	Quantificação de colágenos totais	69
3.1.4	Imuno-histoquímica	69
3.4	Caracterização da Matriz Extracelular de tumores mamários caninos	70
3.4.1	Coloração de H&E	70
3.4.2	Coloração de Tricômio de Gomori	72
3.4.3	Coloração de Picrossírus	74

3.4.4	Quantificação de colágenos totais	76
3.4.5	Coloração Alcian Blue	77
3.4.6	Quantificação de glicosaminoglicanos.....	79
3.4.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
3.4.8	Imuno-histoquímica	82
4.	DISCUSSÃO	85
5.	CONCLUSÃO	92

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias em cadelas são diagnosticadas com frequência na rotina clínica de pequenos animais. Considerada como a principal causa de mortalidade quando se refere aos casos de câncer em fêmeas (LEE et al., 2018), apresenta uma incidência três vezes maior do que ocorre nas mulheres (GRAY et al., 2020; RIVERA; VON EULER, 2011). Cerca de 50% das neoplasias diagnosticadas são consideradas malignas, e o carcinoma é o tipo histológico que ocorre com maior frequência (DO CARMO SILVA et al., 2019; FILHO et al., 2010; NUNES et al., 2018), apresentando um comportamento de crescimento invasivo, com rápida evolução e capacidade de metástase (NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016).

O desenvolvimento de doença metastática pode ser letal para os pacientes, uma vez que pode levar a metástases à distância, sendo essa comumente observada no pulmão, e indicadas como a principal causa de óbito nesta doença. Estudos realizados demonstraram taxas significantes de metástase à distância em pacientes diagnosticados com carcinoma mamário (KIM et al., 2011; PEÑA et al., 2013; RASOTTO et al., 2017).

Ainda, Stratmann et al. (2008) revelaram que 58% das fêmeas caninas desenvolvem um novo tumor nas glândulas mamárias remanescentes após a realização de mastectomia regional para remoção de um tumor único, e 77% das fêmeas necessitam realizar um novo procedimento cirúrgico. Tais dados demonstram que o câncer de mama na espécie canina ainda é um desafio para os médicos veterinários. Levando isso consideração, aumenta-se a busca por novas modalidades terapêuticas, visando qualidade de vida para o paciente e uma maior sobrevida (QUEIROGA et al., 2007, 2010).

No decorrer dos anos, com o avanço das pesquisas houve melhora nas taxas de sobrevida de pacientes com câncer de mama, entretanto o prognóstico de pacientes que apresentam metástase tumoral permanece baixo (TUTT et al., 2008). Apesar da ampla utilização de camundongos como modelo de estudo, é estimado que apenas 6% dos medicamentos tidos como promissores avançam para os testes clínicos (GRAY et al., 2020; NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016).

Recentemente foi reconhecido que o microambiente tumoral desempenha um papel importante no que se refere ao desenvolvimento e comportamento biológico do câncer de mama, sendo crítico para a progressão do tumor, bem como para respostas

terapêuticas (CASE et al., 2017; PLACE; HUH; POLYAK, 2011). Diversos fatores do microambiente tumoral, assim como células imunológicas supressoras, e matriz extracelular (MEC) alterada foram descritos como promotores da progressão e metástase em tumores de mama, além de impedirem uma resposta antitumoral eficaz. Dessa forma, novas terapias direcionadas aos componente da matriz extracelular estão em estudo (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

Diante disso, este trabalho tem como objetivo caracterizar a matriz extracelular de diferentes tipos de carcinoma mamário canino, e utilizar matrizes descelularizadas a fim de visualizar somente a estrutura e componentes da matriz extracelular. Considera-se a hipótese de que o estudo aplicado na matriz extracelular e suas alterações em neoplasias mamárias possam contribuir para o desenvolvimento de novas pesquisas com foco na matriz celular desta neoplasia, e dessa forma favorecer o avanço em terapias medicamentosas e fatores prognósticos que aumentem a sobrevida dos pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia, desenvolvimento e histologia da glândula mamária

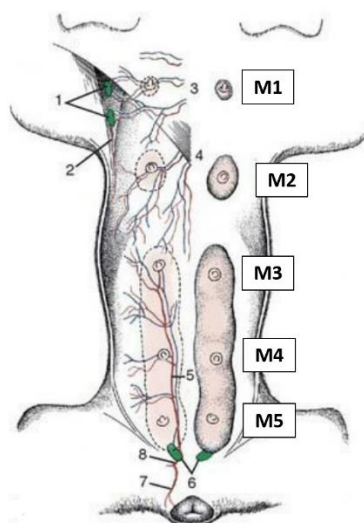
As glândulas mamárias são essenciais para fêmeas que alimentam suas crias, e tem como principal função a produção e secreção de leite para o aleitamento dos filhotes, uma característica considerada exclusiva da classe mamíferos (*Mammalia*) (KÖNIG; LIEBICH, 2009). O seu desenvolvimento é considerado único, visto que têm início ainda na embriogênese, originando-se do ectoderma, dando continuidade após a puberdade, sob a ação dos hormônios sexuais (estrógeno e progesterona) e completando-se somente durante o período gestacional (SORENMO et al., 2011).

Em cães, cada mama é caracterizada por conter um corpo mamário, composto de 8 a 14 lóbulos, tecido conjuntivo e pele, e uma papila mamária (mamilo). O desenvolvimento das glândulas mamárias ocorre a partir da pele embrionária, e por isso apresentam algumas similaridades com as glândulas sebáceas e sudoríparas da pele; e assim como a pele, é responsiva a mudanças hormonais, porém de forma mais especializada (SILVER, 1966).

Logo nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, são formados os espessamentos de células epidérmicas com pequena elevação epitelial. Estes brotamentos se proliferam e penetram no parênquima subjacente, se ramificando e formando duas linhas paralelas, denominadas de crista, as quais partem da raiz membro torácico do cão, e seguem até a região inguinal. Os brotamentos passam a interagir com a circulação fetal após sofrerem um processo de cavitação mediado por hormônios sexuais e, a partir de então, são denominados ductos lactíferos. Ao mesmo tempo, o mesênquima irá formar o estroma da glândula mamária, ou seja, tecido conjuntivo e adiposo, bem como o músculo liso da papila mamária (NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

A anatomia desta glândula varia de acordo com cada espécie, sendo que nos cães a cadeia mamária é composta por cinco pares de glândulas, dispostas em cristas bilaterais, as quais se estendem da região axilar à inguinal. Dois pares estão localizados na região torácica (M1 e M2), dois abdominais (M3 e M4) e o último par se encontra na região inguinal (M5) (DYCE; SACK; WENSING, 2010) (**Fig. 1**).

Figura 1: Vista ventral das glândulas mamárias caninas, evidenciando os vasos sanguíneos e os linfonodos. 1- Linfonodos axilar e axilar acessório; 2 – Ramo da artéria torácica lateral; 3- Ramo de vasos torácicos internos; 4- Ramificações dos vasos epigástricos craniais superficiais; 5- Artéria epigástrica caudal superficial; 6- Linfonodos inguinais superficiais; 7- Ramo labial ventral para a vulva; 8- Artéria pudenda externa. Dyce, Sack e Wensing (2010).



A drenagem linfática normal das mamas torácicas craniais e caudais é realizada pelos linfonodos axilares, e as mamas abdominais caudais e inguinais pelos linfonodos inguinais superficiais; enquanto a drenagem da mama abdominal cranial pode ser realizada de forma mista, isto é, por ambos linfonodos (PATSIKAS; DESSIRIS, 1996). Vale ressaltar que na glândula mamária sadia não ocorre drenagem linfática para a glândula contralateral ou linfonodo, sendo esta ocorrência descrita em casos de obstrução por neoplasias mamárias (PEREIRA et al., 2003).

O suprimento sanguíneo das glândulas torácicas craniais (M1) é realizado pela artéria torácica lateral e artéria torácica interna. Além disso, ramos destes últimos vasos emergem próximo a linha alba para suprir as duas mamas torácicas (M1 e M2). A glândula abdominal cranial (M3) é irrigada pelos vasos epigástricos superficiais craniais. Enquanto que a glândula abdominal caudal e inguinal (M4 e M5) são supridas pela artéria epigástrica caudal superficial, originada da artéria pudenda externa, e profundamente pelos ramos da artéria abdominal cranial e das artérias ilíacas circunflexas profundas (DYCE; SACK; WENSING, 2010; SILVER, 1966).

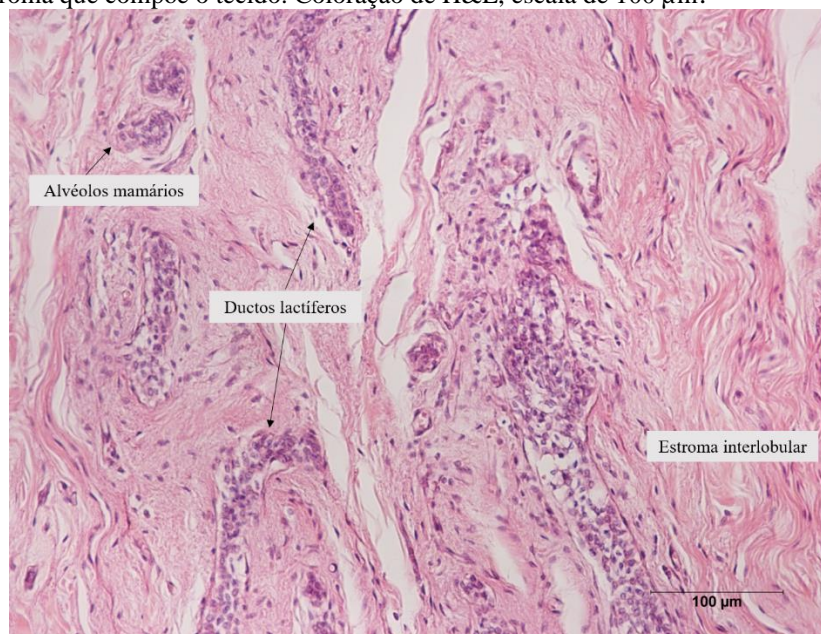
De acordo com a sua microanatomia, as glândulas mamárias são classificadas como glândulas sudoríparas modificadas, do tipo tubuloalveolar exócrina, as quais são circundadas por um estroma fibrovascular repleto de tecido adiposo. Cada mama apresenta um complexo mamário, que consiste em: um corpo mamário, formado por tecido glandular epitelial e tecido conjuntivo intersticial; e uma papila mamária, a qual

contém um ducto papilar envolto por músculo liso (esfíncter) (KÖNIG; LIEBICH, 2009).

O sistema secretor da glândula mamária é constituído de lóbulos e ductos, situados no estroma interlobular, cuja composição é de tecido conjuntivo denso. Os lóbulos caracterizam a unidade secretora, formados por agrupados de alvéolos, cuja morfologia envolve dois tipos celulares: células epiteliais, localizadas na camada interna, e células mioepiteliais na camada externa, sendo estas caracterizadas pela sua capacidade de contração, que promove a secreção do leite. Os alvéolos são envolvidos pelo estroma intralobular, constituído em sua grande parte por tecido conjuntivo frouxo (DAVIDSON; STABENFELDT, 2014; SORENMO et al., 2011).

Da mesma forma, os ductos são compostos pelos mesmos tipos celulares dos alvéolos, contudo irão drenar a secreção dos lóbulos, encaminhando-a em direção aos ductos lactíferos, os quais irão desembocar no seio lactífero, e este eliminará a secreção pelo ducto papilar, um estreito canal que possui comunicação com o meio exterior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Fig. 2).

Figura 2: Fotomicrografia da glândula mamária sadia da espécie canina, evidenciando os alvéolos, ductos e o estroma que compõe o tecido. Coloração de H&E, escala de 100 µm.



Nas fêmeas, estas glândulas ainda sofrem constantes variações de acordo com a fase reprodutiva em que se encontram, como por exemplo na fase de diestro, em que há produção de altos níveis de progesterona e presença de um corpo lúteo funcional e duradouro independente de gestação, levando a uma completa diferenciação lóbulo-

alveolar e secretora mamária (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007; SANTOS; MARCOS; FAUSTINO, 2010).

É no decorrer da gestação, durante e após a lactação que a glândula mamária sofre alterações morfológicas mais significativas, visto que o aumento nos níveis de progesterona durante o período gestacional acarreta o alongamento e ramificação dos ductos, originando múltiplos lóbulos e alvéolos, e por fim estas glândulas são consideradas totalmente desenvolvidas e funcionais no auge da lactação. Quando a glândula está ativa o tecido secretor torna-se proeminente em comparação ao tecido conjuntivo intra e interlobular, os quais são reduzidos. Contudo, após o desmame do filhote iniciam-se as etapas de involução da glândula, no qual ocorre a regressão do parênquima (CHANDRA; CLINE; ADLER, 2010; NOGUEIRA; CASTRO, 2017).

2.2 Neoplasias mamárias caninas

Dentre as afecções que acometem as fêmeas caninas, a neoplasia mamária é considerada a lesão mais frequente em fêmeas não castradas, representando aproximadamente 50% dos diagnósticos realizados neste grupo na rotina clínica. Com relação aos casos de câncer de mama, a prevalência pode variar de acordo com a localização geográfica, sendo maior em locais em que a ovariectomia não é realizada rotineiramente, representando 50 a 70% do total de tumores que acometem as cadelas, considerada assim o tipo mais comum em fêmeas, e incomum em machos (1% ou menos) (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007; VON EULER, 2011).

As cadelas de meia idade e idosas são as mais atingidas, principalmente pelas neoplasias malignas, enquanto as mais jovens raramente são acometidas (NUNES et al., 2018). Relata-se maior acometimento em fêmeas sem raça definida (SRD), entretanto tal dado pode variar de acordo com a região geográfica da realização de cada estudo; sendo observada maior incidência em algumas raças, como Poodle, Duchshund, Yorkshire Terrier, Cocker Spaniel e Pastor Alemão (NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016; SORENMO et al., 2009).

Sugere-se possível envolvimento hereditário e susceptibilidade genética em algumas raças, como é no caso do Springer Spaniel Inglês (BORGE; BØRRESEN-DALE; LINGAAS, 2011; RIVERA; VON EULER, 2011). Rivera et al. (2009) indicaram que associação dos genes BRCA 1 e BRCA 2, relacionados a mutação familiar, podem aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Além disso,

dieta e obesidade também foram citados como fatores de risco para o câncer de mama em fêmeas caninas (CASSALI et al., 2020; SONNENSCHNEIN et al., 1991).

Tendo em vista que as glândulas mamárias possuem como característica a presença de receptores de estrogênio e progesterona, e que estes hormônios geram um efeito mitogênico sobre o epitélio destas glândulas, induzindo a hipertrofia do parênquima mamário, há um maior risco da ocorrência de tumores a cada ciclo estral das fêmeas (BABA; CÂTOI, 2007). Por isso as neoplasias mamárias em cadelas são consideradas como hormônio dependentes, apresentando baixa incidência quando realizada a castração precoce (CARVALHO et al., 2016; WARNES, 2018).

Segundo O'keefe (1995) a realização da ovariário-histerectomia (OH) confere um efeito protetor, reduzindo o risco do desenvolvimento de tumores de mama para 0,5% antes do primeiro ciclo estral, após o primeiro ciclo a taxa aumenta para 8%, e 26% após o segundo ou mais ciclos estrais. Após 4 anos de idade não foram observados benefícios.

Em aproximadamente 65 a 70% dos casos de tumores mamários ocorre envolvimento das glândulas mamárias M4 e M5 (CASSALI et al., 2020), visto que há maior quantidade de parênquima nas regiões abdominais e inguinais, e conseqüentemente maior atividade proliferativa pela ação do estrogênio (CHANDRA; CLINE; ADLER, 2010; MOULTON et al., 1970).

A composição heterogênea do tecido mamário contribui para a complexidade dos tumores mamários, visto que as neoplasias podem se originar de células epiteliais ductuolares e/ou alveolares, células mioepiteliais localizadas adjacentes ao epitélio e/ou células do tecido conjuntivo intersticial (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001). Além disso, os tumores de mama podem ser classificados como simples, compondo-se de apenas um tipo celular, células epiteliais ou mioepiteliais; complexos, sendo constituídos por ambos tipos celulares; ou misto, quando há presença de metaplasia, ou seja, tecido ósseo ou cartilaginoso no tecido mamário, formado a partir de células mioepiteliais (BRODEY; GOLDSCHMIDT; ROSZEL, 1983).

Goldschmidt et al. (2011) estabeleceram uma classificação de acordo com a característica histológica das neoplasias mamárias, dividindo-as em: tumores malignos (carcinomas e seus tipos especiais e sarcomas); tumores benignos e hiperplasias ou displasias mamárias (Tabela 1). Entretanto, múltiplos tipos histológicos podem ocorrer em uma ou mais glândula mamária ao mesmo tempo, e 50% das fêmeas desenvolvem lesões em mais de uma glândula (BENJAMIN; LEE; SAUNDERS, 1999).

Tabela 1. Classificação de neoplasias mamárias caninas proposta por Goldsmith et al. (2011).

Tumores Malignos	Tumores Benignos	Hiperplasia e displasia mamária
1. Carcinoma não infiltrativo (in situ)	1. Adenoma	1. Hiperplasia ductal
2. Carcinoma complexo	1.1 Adenoma simples	2. Hiperplasia lobular
3. Carcinoma simples	1.2 Adenoma complexo	2.1 Hierplasia epitelial
3.1 Carcinoma tubulopapilar	1.3 Adenoma basalóide	2.2 Adenose
3.2 Carcinoma sólido	2. Fibroadenoma	3. Cistos
3.3 Carcinoma anaplásico	2.1 Fibroadenoma de baixa celularidade	4. Ectasia ductal
4. Tipos especiais de carcinoma	2.2 Fibroadenoma de alta celularidade	5. Fibrose focal (fibroesclerose)
4.1 Carcinoma de células fusiformes	3. Tumor misto benigno	6. Ginecomastia
4.2 Carcinoma de células escamosas	4. Papiloma ductal	
4.3 Carcinoma mucinoso		
4.4 Carcinoma rico em lipídeos		
5. Sarcomas		
5.1 Fibrossarcoma		
5.2 Osteossarcoma		
5.3 Outros sarcomas		
6. Carcinossarcoma		
7. Carcinoma ou sarcoma em tumor benigno		

A grande maioria das neoplasias mamárias são consideradas malignas, exibindo um crescimento invasivo, com rápida evolução e capacidade de se disseminar para outros locais, sendo o pulmão, fígado e linfonodos regionais os órgãos mais acometidos (NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016). Dentre elas, o carcinoma, de origem epitelial, ocorre com maior frequência, correspondendo a uma média de 80% dentre o total de neoplasias malignas (DO CARMO SILVA et al., 2019; FILHO et al., 2010; NUNES et al., 2018). Os carcinomas sólidos, micropilares e carcinossarcomas são os tipos de comportamento biológico mais agressivos, associados à pior prognóstico e menor taxa de sobrevida (NUNES et al., 2018).

Além disso, em lesões malignas pode ser observado a deposição de cálcio no tecido, e no caso dos carcinomas ductais invasivos essas deposições podem ocorrer

devido a expansão e ramificação dos ductos durante o processo neoplásico. As calcificações normalmente aparecem em forma de “V” ou bastonetes longos e irregulares (KIM et al., 2017; REIS et al., 2020). O depósito de cálcio já é associado a diagnóstico e prognóstico para o câncer de mama em humanos, sendo determinante para decisões clínicas (COX; MORGAN, 2013).

Para o diagnóstico das neoplasias mamárias, um exame físico minucioso das mamas é essencial, além de exames complementares para avaliação do estado de saúde geral do paciente (SORENMO et al., 2011). Ademais, é importante a realização do estadiamento da neoplasia, por meio da radiografia torácica e da CAAF (Citologia Aspirativa por Agulha Fina) de linfonodos regionais, a qual possui 100% de sensibilidade e 96% de especificidade para identificação de metástases (LANGENBACH et al., 2001). Todavia o diagnóstico definitivo é dado exclusivamente pelo exame histopatológico (NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016).

Por meio da avaliação do tumor primário (1), envolvimento de linfonodos regionais (axilar e inguinal superficial) (2) e identificação de metástase à distância (3) definiu-se 5 estágios clínicos que refletem a progressão do tumor mamário em cães (Figura 3). O estadiamento clínicos de fêmeas acometidas com tumores de mama é uma etapa importante que irá direcionar o tratamento do paciente (CASSALI et al., 2020; OWEN; ORGANIZATION, 1980).

O envolvimento de linfonodo e a presença de metástase à distância refletem os estágios IV e V, respectivamente, e possuem grande impacto para o prognóstico do tumor, assim como o tamanho da neoplasia, visto que cães com tumores maiores que 5cm (T3) tem um tempo de vida menor em comparação aos estágios T1 e T2 (FERREIRA et al., 2009; NUNES et al., 2018).

Tabela 2. Estadiamento clínico para tumores mamários caninos de acordo com o sistema TNM. Cassali et al. (2020).

T – Tumor primário	
T ₁	<3cm diâmetro máximo
T ₂	3 – 5cm diâmetro máximo
T ₃	>5cm diâmetro máximo
N – Linfonodos regionais	
N ₀	Ausência de metástase (histologia ou citologia)
N ₁	Presença de metástase (histologia ou citologia)
M – Metástase a distância	
M ₀	Metástase a distância não detectada
M ₁	Metástase a distância detectada
Estadiamento	

I	T ₁ N ₀ M ₀
II	T ₂ N ₀ M ₀
III	T ₃ N ₀ M ₀
IV	Qualquer T N ₁ M ₀
V	Qualquer T qualquer N M ₁

A excisão cirúrgica, ainda considerada o tratamento de primeira linha para tumores mamários caninos, visa remover os tumores com margens limpas, e dependendo do caso prevenir o desenvolvimento de novos tumores nas glândulas remanescentes (SORENMO; WORLEY; ZAPPULLI, 2019). Pode ser curativa em casos de cães com tipos histológicos menos agressivos e que não apresentam envolvimento de linfonodos e metástases à distância, não indicada apenas para casos de carcinoma inflamatório (CASSALI et al., 2020; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007).

Já as fêmeas caninas que apresentam tumores classificados como alto grau apresentam maior índice de metástase, e dessa forma, quimioterapia e terapias adjuvantes são indicadas. Apesar dos benefícios já descritos em relação ao tratamento quimioterápico para tumores de mama com alto risco de metástase, ainda não foi determinado o agente ou protocolo de quimioterapia mais adequado para o controle da disseminação das células neoplásicas (CASSALI et al., 2020; SORENMO; WORLEY; ZAPPULLI, 2019). Relata-se respostas tumorais mensuráveis ao uso de doxorubicina (ZAMBRANO-ESTRADA et al., 2018), carboplatina (LAVALLE et al., 2012), mitoxantrona e paclitaxel (VON EULER et al., 2013), entretanto alguns quimioterápicos não demonstraram respostas clínicas mensuráveis com o seu uso (TRAN; MOORE; FRIMBERGER, 2016).

De Campos et al. (2018) descreveram uma outra abordagem quimioterápica para os casos de tumores mamários caninos malignos, que é a quimioterapia metronômica oral, a qual envolve a administração de menores doses de quimioterápico em intervalos mais frequentes, com melhores resultados clínicos a longo prazo. Observou-se maior tempo de sobrevivência nos pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia metronômica em comparação aos cães que foram tratados com cirurgia e quimioterapia convencional.

Ultimamente diversos estudos vem sendo realizados envolvendo o uso de terapias alvo adjuvantes, as quais incluem o uso de drogas que tem como finalidade impedir a evolução do câncer, interferindo em moléculas específicas que são expressas individualmente, e responsáveis pela proliferação, sobrevivência, metástase ou

presentes no microambiente de células tumorais (MASOUD; PAGÈS, 2017; VALDIVIA et al., 2021).

Dentre as terapias alvo estudadas com ênfase em neoplasias mamárias caninas estão: a terapia hormonal, que envolvem o uso de ocitocina, desmopressina e inibidores de estrógeno, por exemplo (ILLERA et al., 2006; MARTÍN-RUIZ et al., 2018; SORENMO et al., 2020); receptores de tirosina-quinase, que incluem HER-2, receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs), receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs) e receptor do fator de células-tronco (c-KitR), os quais são superexpressos em neoplasias (DOS ANJOS et al., 2019; LONDON et al., 2012; PRADO et al., 2019; RANIERI et al., 2013); supressão antitumoral do gene p53, considerando que a mutação da proteína p53 está associada aos tumores mamários em cadelas (GRAYTON; MILLER; WILSON-ROBLES, 2017; OCHIAI et al., 2018; TURNER; DAWSON; SULLIVAN, 2012); além das imunoterapias (DOW, 2020).

A sobrevida de cada paciente está relacionada com uma ou mais características clínicas, patológicas e biológicas do mesmo e da sua respectiva neoplasia, podendo variar de acordo o tipo histológico, grau de malignidade, estágio da doença e tratamento utilizado. Sabe-se que o tamanho tumoral, o tipo e grau histológico, além de metástases em linfonodos são fatores prognósticos bem estabelecidos para os cães (FERREIRA et al., 2017; SORENMO; DEANNA; GOLDSMIT, 2013).

A técnica de imuno-histoquímica tem sido adotada na medicina veterinária para determinação de prognóstico nos casos de câncer de mama, influenciando o tempo pós-cirúrgico em fêmeas com tumores de glândula mamária. Os marcadores incluem receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), além do Ki-67, associado a proliferação tumoral e a COX-2, enzima relacionada a carcinogênese mamária, nos casos de carcinoma mamário canino (CASSALI et al., 2020; PEÑA et al., 2014).

O antígeno Ki-67 é considerado uma proteína nuclear não histona, a qual pode ser detectada durante a interfase e mitose. É o biomarcador mais estudado com relação à proliferação e apoptose tumoral canina, podendo ser detectado em diversos tipos de tumores (NOWAK et al., 2016; ZUCCARI et al., 2004). Foi descrita uma alta associação entre o índice de Ki-67 e cães que vieram à óbito devido a malignidade dos tumores de mama, sendo seus índices significativamente mais baixos em tumores mamários benignos quando em comparação aos tumores malignos. Além disso, seus

valores elevados correlacionaram-se positivamente com metástase, pior prognóstico e sobrevida deste tipo tumoral (KADTHUR et al., 2011; KASZAK et al., 2018).

Outro marcador que tem sido estudado em tumores mamários caninos é o CD44, uma molécula de superfície celular que medeia adesão celular e a comunicação com a matriz extracelular (PONTA; SHERMAN; HERRLICH, 2003). Esta molécula possui funções biológicas variadas, e dentre elas estão o crescimento de células tumorais, invasão e metástase, além de ser reconhecida como um marcador para células-tronco cancerígenas em tumores de mama canina (BARBIERI et al., 2015; TANABE et al., 2021).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem características como de autorrenovação e diferenciação assimétrica que contribuem para a tumorigênese, manutenção do tumor e resistência terapêutica (REYA et al., 2001). Estudos indicam que o fenótipo CD44+/CD24- é capaz de identificar propriedades de células tronco cancerígenas em carcinomas mamários caninos, além de estar associado a maior grau de carcinoma, sendo útil para a avaliação do comportamento tumoral (IM et al., 2015).

No que se refere ao câncer de mama, o cão é visto como um excelente modelo no âmbito da oncologia comparada, uma vez que as neoplasias mamárias em cadelas se assemelham aos aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e molecular das neoplasias mamárias manifestadas em mulheres (GRAY et al., 2020; NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016).

2.3 Arquitetura e componentes da Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) contempla os componentes não celulares de um tecido, tais como água, minerais, proteínas e proteoglicanos, que juntamente com as células formam uma rede organizada. Além de proporcionar um importante arcabouço estrutural no qual as células estão inseridas, a MEC também é essencial para a regulação de diversos processos celulares, que incluem crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência e homeostase, os quais irão influenciar na morfologia e diferenciação celular (CLAUSE; BARKER, 2013; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

A composição e o arranjo dos elementos da MEC diferem em cada tipo de tecido, visto que deverão servir à propósitos distintos; sendo assim a formação da MEC e seus componentes ocorre de maneira única durante o desenvolvimento tecidual, um processo dinâmico que envolve a comunicação dos componentes celulares, tais como fibroblastos, adipócitos, elementos epiteliais e endoteliais, em conjunto com o

microambiente celular. Dentre eles, as células estromais, adipócitos e determinadas células imunes são capazes de produzir uma variedade de proteínas que irão compor a MEC e pequenas moléculas que podem influenciar o comportamento de células epiteliais presentes na glândula mamária (BROWNFIELD et al., 2013).

Após o seu desenvolvimento, a MEC ainda é constantemente depositada, degradada e modificada, a fim de manter o equilíbrio entre a sua degradação e secreção, o que confere tração e elasticidade aos tecidos e órgãos (LU et al., 2011; ROHANI; PARKS, 2015).

Dentre os componentes que constituem a matriz extracelular estão incluídas proteínas formadoras de fibras insolúveis, como colágeno, elastina, glicoproteínas, fibronectina (FN), lamininas (LN), proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs); as quais podem se localizar ao redor das células, compondo a MEC intersticial ou a MEC pericelular, conhecida como lâmina basal, que permanecem em contato direto com as células (LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007). Cada uma delas proporciona funções distintas e variadas, consideradas essenciais para o funcionamento adequado do organismo (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

O colágeno, considerado o componente mais abundante da MEC intersticial, representa cerca de 30% da massa proteica de um animal. Dentre os diversos tipos e subtipos existentes, eles são capazes de fornecer resistência à tração e suporte para migração e quimiotaxia aos tecidos, além de regular a adesão celular (ROZARIO; DESIMONE, 2010).

As fibras colágenas compõem o estroma intralobular da glândula mamária, sendo este encontrado ao redor dos alvéolos, enquanto o estroma intrelobular envolve os lóbulos mamários. Os principais colágenos encontrados são o tipo I, III e V, que se organizam em feixes de espessuras e comprimento distintos, e juntamente com os demais componentes da MEC ditam sua organização e funcionalidade (MALLER; MARTINSON; SCHEDIN, 2010; THEOCHARIS et al., 2016).

Além do estroma, os colágenos fazem parte da composição da lâmina basal da glândula mamária, a qual é formada principalmente por laminina, colágeno tipo IV, nidígenos e perlecan, sendo mais espessa nos botões da extremidade terminal. O colágeno IV é considerado essencial para formação de uma lâmina densa adequada, visto que fornece suporte e atua como uma âncora para as células epiteliais mamárias (NYANTE et al., 2019; SILVA, 1988). Wicha et al. (1980) indicou que as células epiteliais da glândula mamária necessitam de uma membrana basal íntegra para sua

viabilidade, considerando que em seus resultados a falta da deposição de colágeno na lâmina basal causou colapso nas estruturas alveolares do epitélio mamário.

Assim como os colágenos, as fibras elásticas, incluindo a elastina, são consideradas valiosas para o tecido mamário, visto que são proteínas altamente elásticas que conferem retorno aos tecidos que passam por alongamentos frequentes, além de estarem fortemente ligadas aos colágenos (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Na glândula mamária sadia, as fibras elásticas foram observadas em maior quantidade entre os alvéolos, abaixo do epitélio secretor, além disso observou-se feixes de fibras de diferentes espessura no espaço interlobular (MARETTOVÁ; MARETTA, 2019).

Dentre o grupo das glicoproteínas presentes na MEC, encontra-se a fibronectina, classificada como uma glicoproteína formadora de fibrila, a qual está diretamente associada com a organização da matriz intersticial, visto que ela interage com diversos componentes da matriz a fim de mediar a fixação da MEC com as células. Da mesma forma que os colágenos, as fibronectinas formam uma rede fibrilar, sendo mediada pela adesão com as integrinas (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011). Apesar disso, não foram descritos níveis significantes de FN no tecido mamário sadio adulto, ao passo que altos níveis desta proteína foram observados no estroma de tumores de mama (PARK; SCHWARZBAUER, 2014).

A adesão das células à MEC é essencial para manter a viabilidade celular e, conseqüentemente, sua interação com os diversos componentes da matriz; para isso seus receptores interagem com variados fatores de crescimento e moléculas de adesão, assim como as integrinas (KATSUMI et al., 2004). Considerada uma proteína transmembrana, a integrina permite a ligação tanto das fibronectinas como de colágenos e lamininas. Este processo de adesão apresenta grande importância para manutenção da homeostase, visto que falhas neste mecanismo estão associadas a ocorrência de migração celular através da MEC (SCHMIDT; FRIEDL, 2010).

Já as lamininas representam um vasto grupo de glicoproteínas heterotriméricas, cuja função principal envolve a interação da célula com a MEC e a montagem da mesma, sugerindo que a formação da membrana basal é iniciada pela polimerização desta proteína. Na glândula mamária é bem estabelecida a presença da LN-111 e LN-332, principalmente na membrana basal, as quais estão relacionadas ao início da formação acinar e indução de contato às células epiteliais, respectivamente (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003; MARINKOVICH, 2007). Estas proteínas, principalmente a LN-111 são importantes para o tecido mamário, visto que são

fundamentais para a secreção e expressão da proteína do leite (AKALU; BROOKS, 2004).

Em tecido epiteliais glandulares, os proteoglicanos, como a decorina, biglicana e lumican estão amplamente associados às fibras colágenas, a fim de criar uma estrutura molecular que fornece tamponamento mecânico e hidratação, sendo fundamental para manutenção de uma MEC funcional e saudável; e proporcionando proteção e resistência à força assim como os colágenos (IOZZO; MURDOCH, 1996; WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). O versican, isto é, outro proteoglicano, também possui um papel importante na MEC, considerado que é capaz de se ligar a diversas moléculas na matriz, como a tenascina, fibronectina, CD44 e integrinas, interações essenciais que regulam a proliferação e diferenciação celular. Por isso, considerando a sua atuação, o versican também se destaca como um dos componentes de uma matriz extracelular neoplásica, já que está envolvido com a progressão, perda de adesão, proliferação celular e invasão (CANAVESE et al., 2011; DAMASCENO et al., 2012).

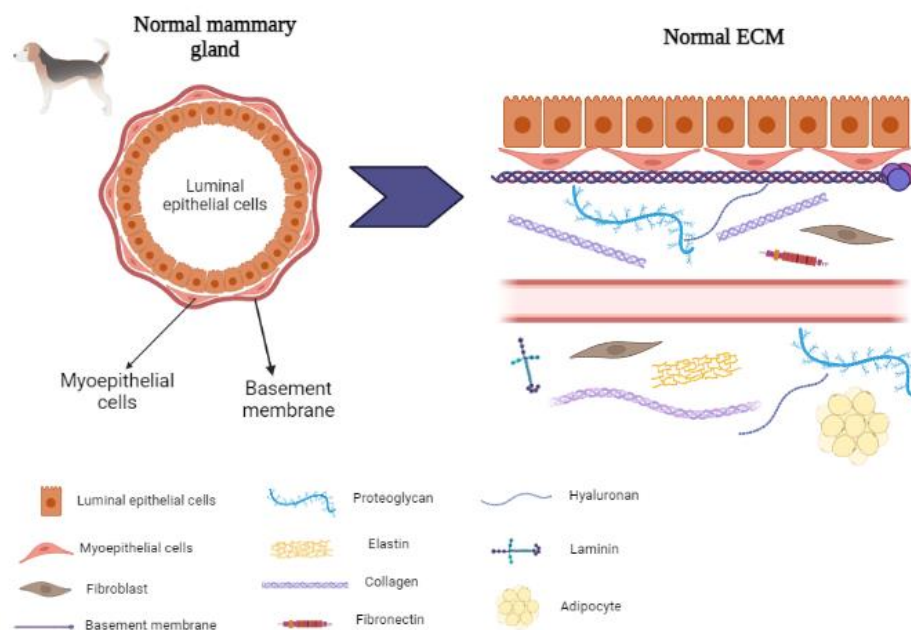
Além das proteínas presentes na MEC, diversos fatores de crescimento e citocinas podem se ligar aos seus componentes, e geralmente isto ocorre por meio dos GAGs, que possibilitam a ligação destes fatores com a lâmina basal e proteínas fibrilares (SILBERSTEIN; DANIEL, 1984). Entretanto, a liberação e ativação destes fatores de crescimento e citocinas pode induzir à proteólise e/ou modificar a rigidez da MEC. Tendo isso em vista e considerando que a organização da MEC pode se alterar no decorrer do desenvolvimento da glândula mamária, é possível que o armazenamento destes fatores de crescimento e citocinas na MEC também se modifique ao longo do tempo (MALLER; MARTINSON; SCHEDIN, 2010).

O Ácido hialurônico (AH), considerado um GAG, gerado pela hialuronidase-1 codificada pelo gene *HYAL-1*, influencia na remodelação da MEC, possuindo um papel essencial na homeostase dos tecidos, principalmente em tecidos fetais, já que provoca a proliferação e migração celular durante a embriogênese, permitindo o desenvolvimento dos tecidos (KAROUSOU et al., 2014; VARALLO et al., 2019). Tolg et al. (2017) demonstraram em camundongos que o acúmulo de AH e a expressão de seus receptores na glândula mamária são maiores durante a fase da gestação, momento em que o remodelamento da glândula e a formação dos lóbulos e alvéolos estão ativos.

Além disso, estudos verificaram que a correlação da regulação positiva deste gene com a recorrência local em tumores mamários caninos, e a expressão de *HYAL-1* apresentou-se significativamente aumentada em cães que apresentavam tumores

matastáticos (SAKALAUŠKAITĖ et al., 2021; VARALLO et al., 2019). A figura 3 mostra um desenho esquemático das proteínas e dos principais componentes da matriz extracelular de uma glândula mamária sadia (**Fig. 3**).

Figura 3: Representação esquemática da estrutura da glândula mamária sadia e componentes que constituem a matriz extracelular deste tecido.



Além das proteínas, há outros componentes da matriz que garantem a manutenção de um tecido funcional, assim como a Lisil oxidase (LOX), uma enzima que auxilia na regulação da tensão do tecido, promovendo rigidez, fibrose e modulando as fibras elásticas (SZAUTER et al., 2005). A LOX e suas quatro enzimas semelhantes LOXL 1, 2, 3 e 4 também catalisam a reticulação covalente de colágeno e elastina, promovendo, portanto, a homeostase dos tecidos conjuntivos. Contudo, foi descrito que esta reticulação de colágeno pode acarretar o recrutamento de células mieloides, as quais se aderem ao colágeno reticulado levando a produção de metaloproteinase-2 de matriz (MMP2), enzima responsável pela degradação da MEC (ERLER et al., 2009; GRAU-BOVÉ; RUIZ-TRILLO; RODRIGUEZ-PASCUAL, 2015).

As metaloproteinases (MMPs) constituem um grupo de importantes enzimas que participam da remodelação da MEC, cuja MMP-2 e MMP-3 são responsáveis por controlar a ramificação da glândula mamária sadia durante sua morfogênese (WISEMAN et al., 2003). Estas enzimas são secretadas de forma inativa, chamadas de forma zimogênica ou pró-MMP, e sua ativação in vivo depende da ativação de diversas

proteases e outras MMPs. Em condições fisiológicas, estas enzimas podem ser expressas em variados tipos de células e tecidos, todavia, elas também estão envolvidas em processos patológicos, acarretando a degradação acelerada da matriz, sendo frequentemente relacionadas à invasão e metástase tumoral (ARESU et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SOMERVILLE; OBLANDER; APTE, 2003).

2.3.1 Alterações da Matriz Extracelular nas neoplasias mamárias

O microambiente tumoral desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer, tendo a MEC como o seu maior componente. Considerando as múltiplas funções exercidas pela matriz, as quais promovem uma resposta celular e fenótipos adequados que são cruciais para manutenção da homeostase, a falha em tais mecanismos leva a sua desregulação e desorganização, podendo induzir doenças como o câncer (LU; WEAVER; WERB, 2012; WEAVER et al., 1997).

Sabe-se que o microambiente que envolve as células cancerígenas pode atuar de diversas maneiras, tanto na iniciação do câncer quanto na sua progressão, afetando as células tumorais de formas distintas, seja promovendo o seu crescimento e sobrevivência como estimulando a sua capacidade de migração e invasão, o que pode implicar em metástase tumoral. Por isso, há um interesse científico em compreender o funcionamento do microambiente nos tumores de mama, levando em consideração que tal entendimento pode auxiliar em questões diagnósticas e terapêuticas (AMINI et al., 2020; HANAHAN; COUSSENS, 2012; LEVI et al., 2016).

O estroma do câncer, assim como também pode ser chamado, além de uma matriz extracelular, é composto por uma variedade de células, como células endoteliais, células imunes e fibroblastos. Em condições fisiológicas, este estroma atua como uma barreira prevenindo a transformação epitelial, entretanto, em resposta às emergentes lesões cancerosas epiteliais, o compartimento estromal passa por uma reprogramação a fim de fornecer suporte ao tumor. A literatura indica que o estroma do câncer suporta o crescimento de células tumorais por meio da secreção e/ou ativação de citocinas, fatores de crescimento, nutrientes e proteases, até mesmo sugerindo que o estroma iniciam o desenvolvimento do tumor a partir de células pré-cancerígenas (ETTLIN et al., 2017; LUO et al., 2015; MUCHA et al., 2014; PÖSCHEL et al., 2021; RUTNAM; WIGHT; YANG, 2013).

O câncer é capaz de produzir diversas alterações na conformação e estrutura da MEC, interferindo nos seus componentes e na adesão celular. No que se refere as

neoplasias mamárias, elas promovem transformações significativas nos constituintes da glândula mamária sadia, em que as células cancerígenas juntamente com os fibroblastos ativados levam a produção de uma matriz fibrosa, a qual pode ser denominada desmoplasia, e está associada a malignidade e pior prognóstico (DE SOUZA et al., 2018; INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016).

A fibrose, outro termo para se referir a desmoplasia, pode ser caracterizada como um processo biossintético ativo dado pelo acúmulo desregulado de MEC nos tecidos, e possui como principais mediadores os fibroblastos, células tronco-mesenquimais, fibrócitos e células estreladas. Gujam et al. (2014) relataram em pacientes humanos com câncer de mama uma correlação de maiores áreas de fibrose com maior recorrência do tumor e pior prognóstico. Da mesma forma, estudos citaram a importância da fibrose para a progressão de tumores mamários caninos, visto que se encontrou um baixo percentual de fibrose em tumores mistos benignos, enquanto que os tumores mamários caninos mais agressivos, como o carcinoma tubular, apresentaram maior percentual. Alguns estudos relatam que conforme a progressão da fibrose ocorre um aumento gradual da sinalização de células pré-neoplásicas com citocinas pró-inflamatórias (DE SOUZA et al., 2018; KALLURI; ZEISBERG, 2006).

No entanto, ainda há uma controvérsia entre alguns estudos se a fibrose também pode atuar como supressora do câncer, visto que há indícios de que os fibroblastos de um tecido sadio e as células tronco-mesenquimais são importantes para contenção do início do câncer, limitando a invasão de células cancerígenas (ALKASALIAS et al., 2014; BRUNO et al., 2013). Chandler et al. (2019) indicaram que a fibrose pode ser supressora nas fases iniciais do câncer, porém conforme a progressão do câncer, as células tumorais podem influenciar os componentes do estroma a deixar de restringir o câncer, e atuando em um novo papel como promotor do câncer.

Outro componente importante para o desenvolvimento tumoral são as MMPs, as quais criam um microambiente tumoral favorável por meio da degradação de colágenos, promoção da angiogênese tumoral e liberação de fatores de crescimento ativos. As MMP-2 e MMP-9 são frequentemente relacionadas com invasão e metástase tumoral, tendo em vista que estas enzimas levam a degradação do colágeno tipo IV, presente na membrana basal, rompendo assim um componente estruturais, e conseqüentemente contribuindo para o crescimento e disseminação do tumor (KAWAI et al., 2006; STERNLICHT; WERB, 2001; WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

Em tumores mamários caninos, a expressão da MMP-9 foi associada a taxa de proliferação, malignidade tumoral e grau histológico, podendo considerá-la como um possível fator prognóstico (ARESU et al., 2011; SANTOS et al., 2012; VINOETHINI; BALACHANDRAN; NAGINI, 2009). Além disso, Santos et al. (2011) relataram maior expressão de MMP-2 em tumores mamários malignos de cães do que em tumores benignos e no tecido mamário sadio. A presença desta enzima já foi associada a um aumento de invasão de células tumorais metastáticas, além da degradação da MEC (ERLER et al., 2009).

Uma enzima associada a MMP-2 é a LOX, já que a liberação desta enzima pode provocar a produção de MMP-2 no microambiente tumoral. A liberação da LOX no microambiente tumoral ocorre em resposta a hipóxia intratumoral, a qual é apresentada pela maioria dos tumores sólidos (NISHIOKA; EUSTACE; WEST, 2012). Saleem et al. (2019) observaram em seu estudo por meio do PCR em tempo real um aumento significativo (três vezes maior) da LOX em cães com tumores mamários do que em comparação aos cães saudáveis, indicando também um possível papel para o diagnóstico e prognóstico das neoplasias mamárias caninas.

O carcinoma possui uma característica crucial que envolve a capacidade de migração através de tecidos circundantes, e para isso, as células cancerígenas necessitam atravessar a barreira de colágeno, utilizando de métodos tais como força mecânica, invasão de células âncora e aumento de MMPs. Estudos indicam que o estroma tumoral de uma neoplasia primária não metastático difere daquele em que as células apresentam alto potencial metastático, podendo recrutar diferentes tipos de células para o estroma (KELLEY et al., 2014; NABA et al., 2014).

Conforme as células tumorais se proliferam, a MEC ao redor sofre mudanças em sua arquitetura, incluindo o aumento de fibronectinas e colágenos I e V, o que favorece a progressão tumoral, visto que interfere na adesão célula-célula; em contrapartida é observada redução do colágeno IV, em função da degradação da membrana basal (MALIK; LELKES; CUKIERMAN, 2015). De acordo com os resultados de Acevedo et al. (2021), o colágeno tipo III também diminui nas neoplasias mamárias caninas, de acordo com a sua malignidade, sendo inversamente proporcional ao aumento na graduação destes tumores.

Ademais, observa-se que durante a progressão do câncer de mama, a expressão da LM-111 é frequentemente perdida, visto que ela é componente importante da membrana basal, enquanto a expressão de LM-332 está associada a tipos neoplásicos

agressivos, induzindo migração e invasão de células de carcinoma mamário (KWON et al., 2012).

No câncer de mama, as fibras colágenas se apresentam em grande maioria, espessas, enrijecidas e alinhadas de forma perpendicular ao limite tumoral; arquitetura que facilita a invasão de células tumorais e ocorrência de metástase (PROVENZANO et al., 2008). Estudos anteriores realizados em humanos demonstraram que a progressão tumoral do carcinoma mamário é regulada pela densidade e da organização das fibras colágenas, revelando que o alinhamento do colágeno perpendicular ao limite do tumor pode ser considerado um fator prognóstico (CONKLIN et al., 2011).

Case et al. (2017) realizou um estudo similar em carcinomas mamário canino, o qual indicou que a ausência do limite tumor-estroma e aumento de largura das fibras colágenas foram correlacionados com diminuição da taxa de sobrevida dos pacientes. Ainda, foi descrito que fibras de colágenos mais curtas foram associadas a tipos de carcinomas mamários mais agressivos em cães do que em comparação aqueles de menor agressividade (GARCIA et al., 2021).

Além disso, é possível observar alterações de outras proteínas presentes na matriz extracelular destes tumores, como é o caso dos proteoglicanos. Estas proteínas são normalmente expressas durante o desenvolvimento embrionário com propriedades adesivas, entretanto, no câncer de mama, elas têm a capacidade de modular as interações célula-matriz e as vias de sinalização, contribuindo para adesão de células tumorais (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016; OSKARSSON et al., 2013). A Tenascina-C, por exemplo, é uma enorme proteína de matriz que geralmente está ausente nos tecidos adultos, porém apresenta-se aumentada em condições patológicas, como inflamação, fibrose e cicatrização de feridas (CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003).

Foi descrito que a Tenascina-C também aumenta consideravelmente no estroma de tumores quanto em comparação a tecidos saudáveis, podendo afetar o comportamento de células tumorais. A expressão desta proteína em neoplasias mamárias caninas foi significativamente correlacionada com maiores graus histológicos, isto é, maior malignidade e invasão vascular/linfática, principalmente em carcinomas simples (MUKARATIRWA; NEDERBRAGT, 2002; YOSHIMURA et al., 2011).

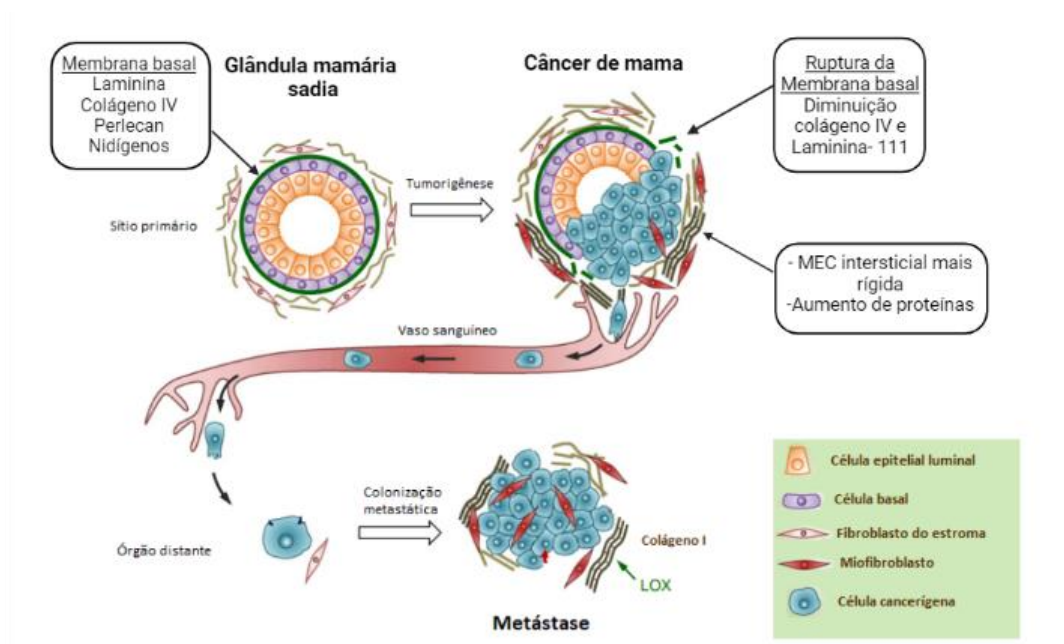
Outro proteoglicano de destaque para o câncer de mama é o Versican, caracterizado como um proteoglicano de sulfato de condroitina, este apresenta um papel importante, tendo em vista o seu envolvimento na progressão tumoral, proliferação e

diferenciação celular, além de participar na adesão celular e angiogênese (DAMASCENO et al., 2014; ERDÉLYI et al., 2005; KISCHEL et al., 2010). Damasceno et al. (2016) descreveram fraca expressão de versican estromal em tumores mistos benignos, enquanto foi observada maior expressão estromal em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas. Ainda, nestes tumores áreas epiteliais invasivas apresentaram expressão mais forte quando em comparação com áreas in situ, indicando uma relação direta entre a expressão do versican e invasividade.

Dentre o grupo de glicosaminoglicanos, o AH, componente abundante da MEC, é capaz de regular a adesão, movimento, crescimento e diferenciação celular, atuando por meio de receptores de superfície, como o CD44. Em casos de câncer de mama, é observado um intenso aumento nos níveis de AH, dessa forma, estudos indicaram que sua inibição promove a redução significativa da sua progressão (LI et al., 2007).

Por fim, as células do câncer de mama dependem de certos componentes e sinais mediados pela MEC para sobreviver ao estresse ambiental, conseqüentemente, a inibição desses componentes pode resultar em células tumorais mais vulneráveis, contribuindo assim para abordagens terapêuticas inovadoras, tidas como valiosas para a prática clínica futura (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016; JENA; JANJANAM, 2018) (**Fig. 4**).

Figura 4: Desenho esquemático das alterações da MEC durante a progressão do câncer de mama. Adaptado de Insua-rodríguez e Oskarsson (2016).



2.4 A Matriz Extracelular como resistência a terapias no câncer

Apesar de na medicina veterinária ainda ser escasso os estudos sobre a MEC como alvo de terapias para o câncer, na medicina humana há diversos trabalhos sobre o envolvimento da MEC no câncer e seus impactos no desenvolvimento de novas terapias. Um dos obstáculos para o sucesso das terapias medicamentosas no câncer é a resistência terapêutica, a qual pode ser causada por inúmeros fatores, sendo a MEC considerada uma das possíveis causas de resistência fisiológica das células cancerígenas ao tratamento (NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEI, 2019; ZAHREDDINE; BORDEN, 2013).

Aparentemente, a MEC atua como um substrato que favorece mecanismos de sobrevivência e alguns de seus componentes são capazes de induzir vias de células tronco, fornecendo ancoragem a estas células e aumentando dessa forma a adequação de células metastáticas (FARMER et al., 2009). Além da capacidade das células tronco de induzir a recidiva tumoral, estas células também podem servir como resistência à quimioterapia padrão, visto que o aumento do nicho destas células no microambiente tumoral pode dificultar a penetração da droga nesta região (NOLL; VANDYKE; ZANNETTINO, 2014; YU et al., 2018).

Já foi descrito anteriormente em câncer de mama, que as células tronco podem adquirir suas características por meio da interação ácido hialurônico (AH)-CD44, aumentando a resistência aos medicamentos. Foi visto que a síntese de AH e sua expressão se associaram a um mau prognóstico dos pacientes (AUVINEN et al., 1997; ZHANG et al., 2016). Desenvolveu-se um medicamento, o 4-Metilumbeliferona (4-MU), já aprovado para terapia biliar que inibe a síntese de AH. Em um estudo realizado com células de carcinoma mamário notou-se diminuição no acúmulo de AH intracelular ao utilizar esta terapia (KARALIS et al., 2019).

Além disso, a rigidez da MEC nos tumores também é um fator que favorece a resistência as drogas no câncer. Por meio da elastografia de mama Hayashi et al. (2012) avaliou a rigidez tumoral e verificou que tumores menos rígidos foram mais responsivos ao tratamento em comparação aos que apresentaram maior rigidez. Esta característica da matriz estimula condições hipóxias dentro do microambiente tumoral, condição a qual deixa os vasos sanguíneos mais permeáveis, fornecendo nutrientes de maneira seletiva às células tumorais e atuando como uma barreira para a penetração de quimioterápicos (AHIRWAR et al., 2018; QIAO et al., 2019).

Um estudo realizado por Farmer et al. (2009) revelou uma assinatura de 50 genes derivadas de componentes estromais do câncer de mama poderia prever uma resistência metastática dos seguintes quimioterápicos: 5-fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida. Ademais, foi evidenciado que o colágeno tipo I medeia a resistência ao efeito antimigratório da doxorubicina (MISRA et al., 2003; SAID et al., 2012).

Além da quimioterapia, a resistência promovida pela MEC também se estende a terapias endócrinas e direcionadas, assim como a radioterapia. Com relação a terapia direcionada, observou-se que a LM-332 acarreta resistência à terapia anti-HER2; e quanto a radioterapia foi descrito que as proteínas presentes na matriz, fibronectina e laminina, aumentam a resistência à radiação ionizante e drogas citotóxicas em células tumorais humanas e células normais in vitro (CORDES et al., 2003; YANG et al., 2010).

3. CONCLUSÃO

Nota-se que as neoplasias mamárias ainda representam um desafio para o médico veterinário, considerando as taxas de metástase e recidivas, que dificultam a escolha de uma terapia eficaz contra a doença. Existem diversas possibilidades disponíveis, no entanto é possível perceber a importante atuação que a MEC tem no desenvolvimento e progressão do câncer de mama, sendo remodelada e modificada de diferentes formas na presença de tumores de mama, e inclusive servindo como resistência para terapias contra o câncer.

O seu estudo aprofundado juntamente com novas pesquisas relacionadas às alterações acarretadas pelo câncer pode ser considerado essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra o câncer de mama, tendo como alvo principal os componentes que constituem a MEC. Assim sendo, a MEC tem potencial de fornecer novas pistas e indicadores para o avanço de terapias e tratamentos, contribuindo para a melhora da qualidade de vida e aumento da sobrevivência de pacientes com a doença.

CAPÍTULO I: COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE DESCELULARIZAÇÃO EM TECIDO MAMÁRIO SADIO E ACOMETIDO COM NEOPLASIA MAMÁRIA NA ESPÉCIE CANINA

RESUMO: As fêmeas caninas são frequentemente acometidas por neoplasias mamárias, as quais representam 50 a 70% dos diagnósticos referentes a câncer. A matriz extracelular (MEC) tem se mostrado fundamental para o desenvolvimento do câncer de mama, visto que a interação das células tumorais com os seus componentes pode promover invasão e crescimento tumoral. Neste contexto, a bioengenharia tecidual tem buscado realizar o desenvolvimento de *scaffolds* 3D que mimetizem a estrutura da MEC, por meio de um processo de descелularização que permite testes de novas terapias. Tendo isso em vista, este estudo tem como objetivo comparar distintos protocolos de descелularização de tecido mamário sadio e acometido com neoplasia mamária da espécie canina, a fim de estabelecer o protocolo mais adequado para ambos os tecidos. Foram realizados 4 protocolos com o uso de diferentes detergentes, os quais incluíram o Triton X-100 1% + EDTA 5mM por 72 horas (A), SDS 0,5% + EDTA 5mM por 72 horas (B), SDC + EDTA 5mM por 72 horas (C) e SDS 0,5% + EDTA 5Mm durante 32 horas, seguido de Triton X-100 + EDTA 5mM por 40 horas (D). Observou-se que o protocolo A obteve melhor descелularização e maior preservação dos componentes da MEC tanto no tecido sadio quanto nos tecidos neoplásicos, enquanto o protocolo B causou maior degradação da matriz e o protocolo C não obteve uma descелularização completa do tecido. Os métodos adotados para o processo de descелularização no protocolo A foram eficazes e capazes de manter a estrutura da MEC preservada, possibilitando a utilização desta técnica para futuros estudos e realização de pesquisas pré-clínicas em neoplasias mamárias da espécie canina.

Palavras-chave: matriz extracelular, bioengenharia tecidual, scaffolds, tumores de mama.

1. INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária na espécie canina é o principal tipo de câncer que acomete fêmeas, representando aproximadamente 50 a 70% dos casos de câncer reportados (MERLO et al., 2008; VALDIVIA et al., 2021). Existem diferentes tipos histológicos de tumores de mama, entretanto a maioria são classificados como malignos, com uma incidência de 41 a 68%. Grande parte destes casos descrevem a ocorrência de metástase à distância, a qual pode ser letal para os pacientes, uma vez que são comumente observadas no pulmão (KIM et al., 2011; PEÑA et al., 2013; RASOTTO et al., 2017).

A terapia cirúrgica com ressecção completa de margens tem sido considerada padrão ouro para um tratamento eficiente, levando a remissão completa nos casos de tumores benignos (SLEECKX et al., 2011; VALDIVIA et al., 2021). Contudo em tumores malignos quase metade dos casos foram associados com ocorrência de

metástase ou recidivas, e em casos classificados com um prognóstico desfavorável, muitas vezes a cirurgia não é capaz de promover uma remissão completa do tumor. (QUEIROGA et al., 2007, 2010).

Assim como na medicina veterinária, na medicina humana o câncer de mama é a principal causa de óbito na população feminina em relação aos casos por câncer. Dessa forma, diversos estudos em ambas as áreas buscam por um diagnóstico precoce e novas modalidades terapêuticas (PASCOLI et al., 2017; SALAS et al., 2015; SANTOS et al., 2020); e utilizam o cão como um modelo de estudo, uma vez que as neoplasias mamárias em cadelas se assemelham aos aspectos epidemiológicos, clínicos, patológicos e molecular ao câncer de mama em mulheres (GRAY et al., 2020).

Apesar dos avanços na pesquisa e desenvolvimento na área da oncologia, tem-se descrito que cerca de 95% dos medicamentos oncológicos na fase de ensaios clínicos não são aprovados. Parte desta falha envolve a falta de modelos pré-clínicos adequados que representem a complexidade e o microambiente do câncer (KOLA; LANDIS, 2004; NGUYEN et al., 2013).

Sabe-se que a MEC apresenta um papel muito importante na progressão e desenvolvimento do câncer, tendo em vista que é capaz de regular diversos marcadores do câncer, assim como invasão e metástase (OUDIN et al., 2016). As células tumorais interagem com a MEC por meio de integrinas, e estas interações modificam o ambiente tumoral, promovendo angiogênese, invasão, crescimento tumoral, e por fim levando a ocorrência de metástases (EMANUELLI et al., 2020; HENKE; NANDIGAMA; ERGÜN, 2020; QUAIL; JOYCE, 2013; SOUZA et al., 2022; YUE, 2014).

Levando isto em consideração, estudos relacionados a bioengenharia tecidual têm sido realizados no ramo da oncologia, desenvolvendo *scaffolds* biológicos funcionais, a fim de recriar o microambiente tumoral em laboratório e mimetizar o microambiente do tumor, além de investigar as interações dinâmicas célula-célula e microambiente célula-tumor (ALABI; LARANGER; SHAY, 2019; MOLLICA et al., 2019).

Para isso, pesquisas utilizam o método de descclularização, processo que elimina as células nativas e material genético do tecido ou órgão, e mantém sua composição e características bioquímicas e biomecânicas, retendo os componentes e estrutura da MEC. Este tecido descclularizado é capaz de prover um valioso andaime 3D para pesquisas pré-clínicas de tumores, tornando possível testes com o repovoamento de

diferentes células e testes de novas terapias (GARCÍA-GARETA; PÉREZ; GARCÍA-AZNAR, 2022; KAR et al., 2019; LV et al., 2021; WISHART et al., 2020).

Atualmente os métodos mais utilizados para a descclularização de tecidos incluem os mecanismos biológicos, químicos ou mecânicos. Dentre eles ainda existem diferentes agentes e técnicas que podem ser combinados de maneiras distintas. É possível utilizar enzimas para quebrar fragmentos de DNA, detergentes como SDS, Triton X-100 e SDC, e métodos mecânicos, como por exemplo técnicas de agitação, pressão hidrostática e descongelamento. Para obtenção de uma MEC descclularizada ideal é necessário remover os componentes celular e ao mesmo tempo preservar ao máximo os seus componentes, e para isso o estabelecimento de um bom protocolo é fundamental (FERREIRA; GASPAR; MANO, 2020; GILPIN; YANG, 2017; PINTO et al., 2017) .

Considerando a relevância das neoplasias mamárias para as fêmeas caninas e para a rotina clínica de pequenos animais, juntamente com as possibilidades fornecidas pela bioengenharia de tecido, este estudo visa testar diferentes protocolos de descclularização em tecido mamário sadio e acometido com neoplasia mamária da espécie canina. De forma a aperfeiçoar e estabelecer o protocolo mais adequado e com maior preservação da MEC, tendo em vista que não há nenhum estudo com enfoque na descclularização de tumores mamários na espécie canina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aprovação no Comitê de Ética

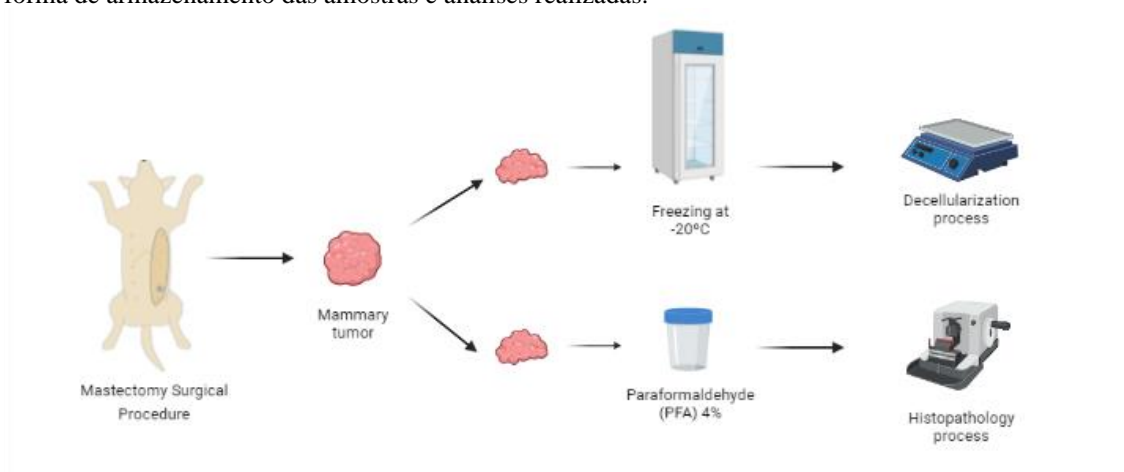
Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ) número 3966081220.

2.2 Coleta de amostras

A coleta de amostras de tecido mamário foi proveniente de fêmeas caninas que vieram à óbito ou foram submetidas ao procedimento de mastectomia em decorrência da neoplasia mamária. Nenhum animal foi submetido a cirurgia para a realização deste projeto. Os procedimentos foram realizados de acordo com a conduta de médicos veterinários do Hospital Escola Veterinário de Jaguariúna (HEV- UNIFAJ). O tecido mamário utilizado neste estudo foi autorizado pelo tutor por meio da autorização de uso para fins didáticos.

Foram coletadas amostras de 4 fêmeas acometidas com tumores de mama e 1 sem sinal de acometimento desta glândula, e ambos os tecidos foram divididos em duas partes, sendo a primeira armazenada em paraformaldeído (PFA) a 4% para posterior classificação do tipo neoplásico nos tecidos acometidos com tumores de mama; enquanto a segunda parte do tecido foi congelada à -20°C para realização do processo de descclularização (**Fig. 1**).

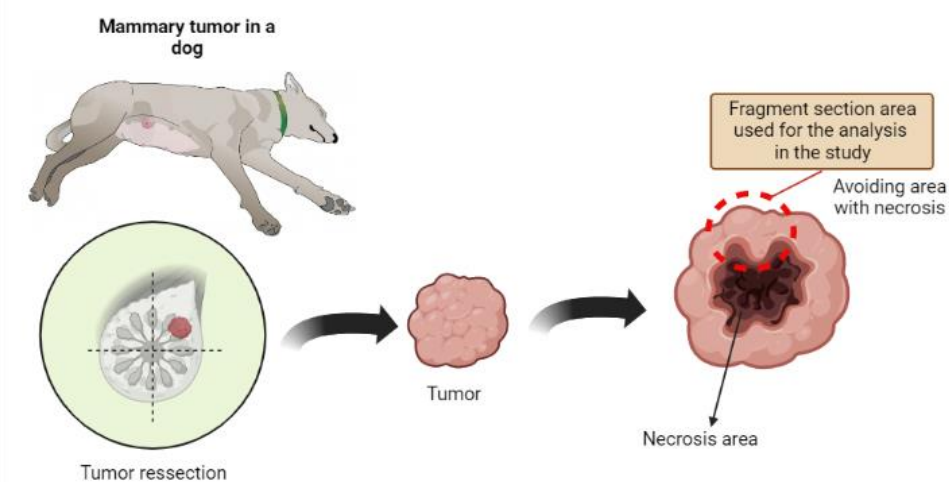
Figura 1: Resumo esquemático da coleta das amostras de tecido mamário sadio e neoplásico, seguida da forma de armazenamento das amostras e análises realizadas.



2.3 Análise histopatológica

Após a coleta da amostra, a fixação do tecido foi feita por imersão em PFA 4%, e após 48 horas foi substituído pela solução de álcool 70%. Para início do processamento histológico foram realizados cortes de pequenos fragmentos com auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo selecionadas regiões próximas a borda do tumor, evitando áreas com necrose (ARAÚJO; CASSALI, 2017) (**Fig. 2**).

Figura 2: Desenho esquemático do local de coleta de amostras dos fragmentos de neoplasias mamárias.



Em seguida, os fragmentos foram colocados em cassetes e permaneceram em uma mesa agitadora, os quais foram submetidos ao processo de desidratação, isto é, uma série de banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%); e diafanização, por meio de banhos de xilol por aproximadamente uma hora. Logo após, procedeu-se a impregnação em parafina e posterior inclusão dos fragmentos nos blocos de parafina.

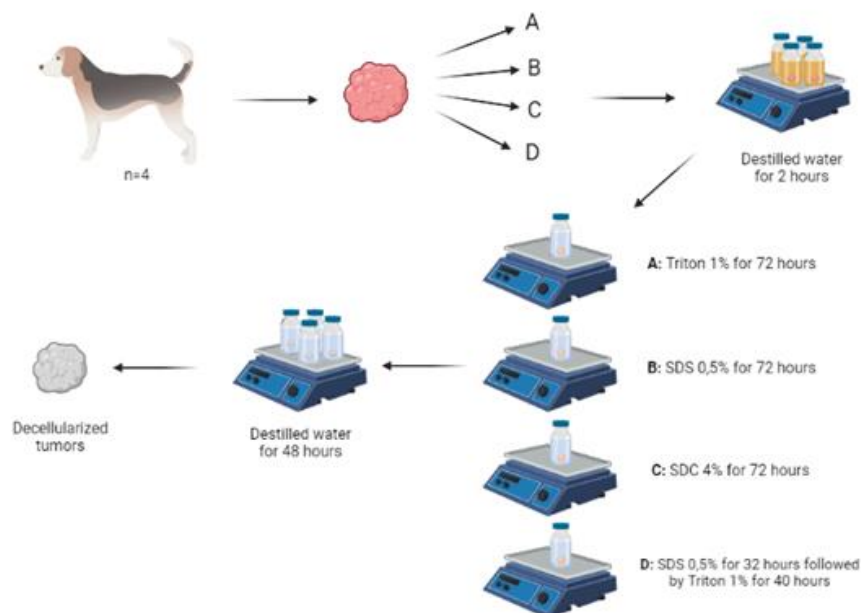
Os cortes foram realizados na espessura de 5 micrômetros em micrótomo automático (Leica, RM2165, Alemanha) e colocados em lâminas histológicas para posterior desparafinização em estufa à 60°C durante o período de duas horas. Com isso, iniciou-se o procedimento de coloração das lâminas, onde foram selecionadas as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricômio de Gomori, Alcian Blue - Histokit Alcian Blue Ph 2,5 (EP-12-20018) e Picrossírus – Histokit Picrossírus-Hematoxilina (EP-11-20011), sendo os dois últimos realizado de acordo com instruções do fabricante.

2.4 Protocolos de descelularização

Para o estabelecimento de um protocolo de descelularização eficaz e adequado para o tecido mamário sadio e neoplásico foram testados 4 protocolos distintos (A: Triton X-100 1% + EDTA 5mM por 72 horas, B: SDS 0,5% + EDTA 5mM por 72 horas, C: SDC + EDTA 5mM por 72 horas e D: SDS 0,5% + EDTA 5mM durante 32 horas, seguido de Triton X-100 + EDTA 5mM por 40 horas). Todos os protocolos testados foram mantidos em temperatura ambiente e em rotação orbital a 250 rpm; as amostras permaneceram em agitação com os detergentes mencionados acima por 72 horas, realizado trocas a cada 12 horas, seguido por lavagem em água destilada durante 48 horas (**Fig. 3**).

Após a realização dos protocolos de descelularização descritos acima, os fragmentos que apresentaram presença de centros de calcificação permaneceram em solução PBS 1% + EDTA 50mM durante um período de 2 meses para descalcificação.

Figura 3: Desenho esquemático do processo de descellerização dos tecidos mamários neoplásico e sadio, evidenciando as etapas realizadas após a divisão do tumor em 4 fragmentos.



2.5 Técnica de Fluorescência 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI)

Por meio desta técnica é possível realizar a marcação dos núcleos celulares presentes nos tecidos. Dessa forma, os fragmentos foram emblocados em OCT (Tissue Teck O.C.T), seguido de cortes em criostato, realizados na espessura de 10 micrômetros à -27°C . As lâminas foram mantidas em freezer até a realização do procedimento. Antes da coloração, as lâminas em questão foram descongeladas em temperatura ambiente por 15 minutos, e após foi aplicada a solução DAPI (1:10.000 diluído em PBS 1X) na ausência de luz. Então, as lâminas foram lavadas com água destilada e observadas em microscópio de fluorescência (LEICA RM 2065).

2.6 Quantificação de GAGs

Todas as imagens foram quantificadas por meio da utilização do Software ImageJ – Color_Deconvolution2. Foram adquiridas 10 imagens de diferentes regiões do tecido utilizando o Microscópio de Luz (LEICA RM 2065) em uma lente objetiva de 20x. A marcação de azul turquesa na coloração de Alcian Blue é indicativa de presença de GAGs/mucinas ácidas, esta coloração foi separada pelo ImageJ por meio de limiares manuais de matiz, saturação e valores de brilho, e o conteúdo foi quantificado por intensidade média de azul turquesa por área de tecido.

2.7 Quantificação de DNA

Para quantificação de DNA genômico foi utilizado 25 mg de tecido mamário neoplásico nativo e descelularizado, valendo-se do QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram digeridas overnight a 56°C com Proteinase K e tampão de lise do kit, e em seguida foram purificadas e analisadas por espectrofotometria a 260nm (Nanodrop, ThermoScientific).

3. RESULTADOS

3.1 Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes incluídos no estudo

A **Tabela 1** evidencia os dados clínicos dos pacientes selecionados para este estudo, que incluem raça, sexo, idade, fêmea castrada ou inteira, presença ou não de obesidade, localização do tumor, além do diagnóstico histopatológico de cada neoplasia mamária.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo associados ao diagnóstico histopatológico.

Animal	Raça	Sexo	Idade	OSH	Obesida de	Local da coleta	Diagnóstico histopatológico
Animal 1	Pinscher	F	19 anos	Não	Não	M5 entre o antímero direito e esquerdo	Comedocarcinoma mamário, grau II.
Animal 2	Poodle	F	11 anos	Não	Não	M2 antímero esquerdo	Carcinoma mamário complexo, grau I.
Animal 3	Labrador	F	7 anos	Não	Sim	M4 antímero direito	Carcinoma mamário sólido, grau III.
Animal 4	Cocker	F	12 anos	Sim	Sim	M5 antímero direito	Carcinoma mamário tubular simples, grau I.
Animal 5	Teckel	F	8 anos	Sim	Não	M4 antímero direito	Ausência de neoplasia (Glândula mamária sadia)

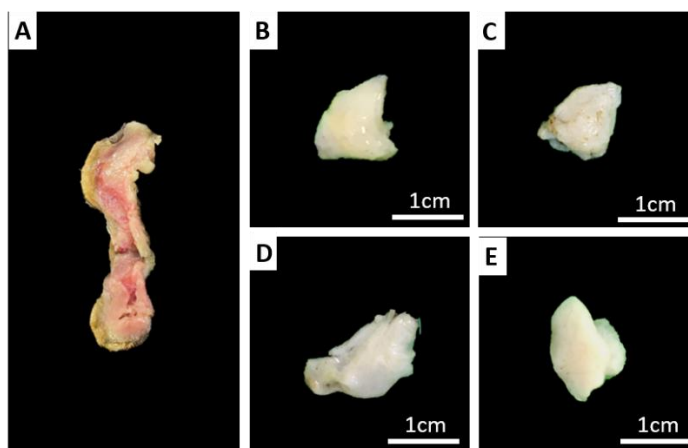
3.2 Comparação dos protocolos de descelularização

3.2.1 Análise macroscópica da glândula mamária sadia

Observamos o tecido mamário sadio (nativo) com coloração rósea, moderada quantidade de parênquima, e nota-se o tecido adiposo em coloração palha, presente em pequena quantidade na glândula mamária (**Fig. 4A**). Após os fragmentos serem

submetidos ao processo de descélularização, observa-se uma coloração esbranquiçada nos tecidos submetidos aos quatro protocolos testados, em razão da ausência de componentes celulares no tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011), e a quantidade de parênquima deste tecido permaneceu preservada (**Fig. 4B, C, D e E**).

Figura 4. Fragmentos de tecido mamário sadio nativo e descélularizado. A- Glândula mamária (tecido nativo); B – Fragmento descélularizado com o detergente Triton X-100 1% (Protocolo A); C - Fragmento descélularizado com o detergente SDS 0,5% (Protocolo B); D - Fragmento descélularizado com o detergente SDC 4% (Protocolo C); E - Fragmento descélularizado com o detergente SDS 0,5% e Triton X-100 1% (Protocolo D).



3.2.2 Análise microscópica da glândula mamária sadia

As análises microscópicas realizadas na glândula mamária sadia demonstraram o tecido nativo com a presença de células e componentes da MEC (**Fig. 5A, F, K e P**), enquanto o tecido descélularizado mostrou apenas a estrutura da MEC sem a presença de células. Entretanto, notou-se diferenças significantes entre os protocolos de descélularização A, B, C e D.

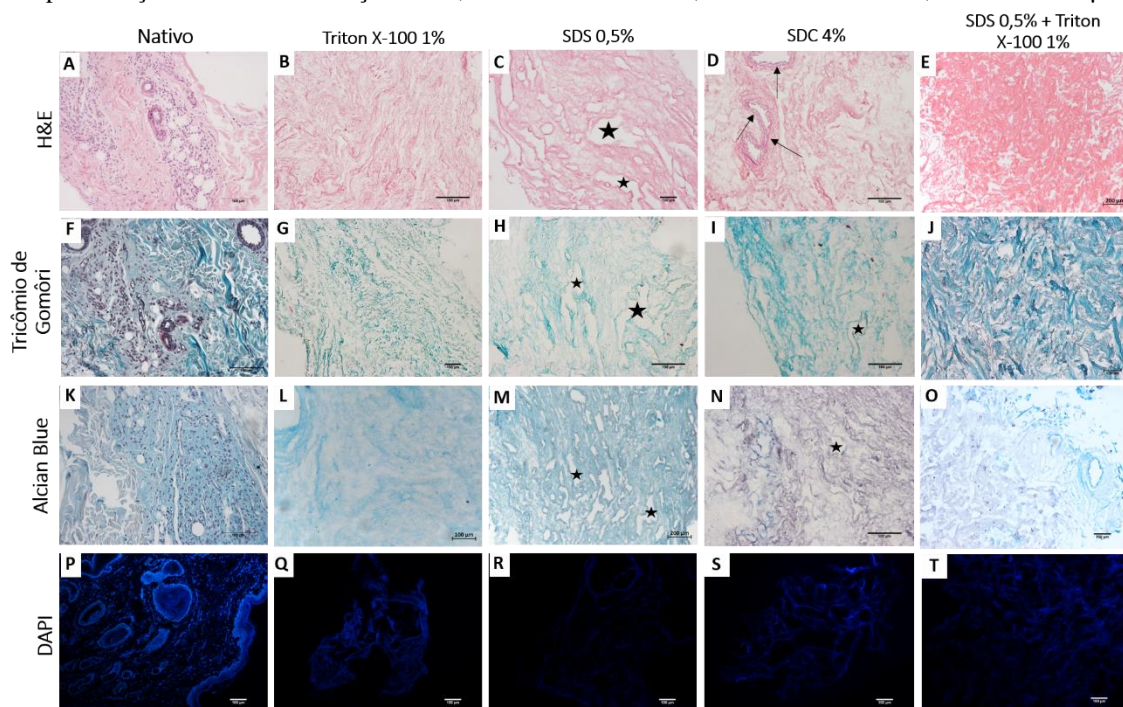
No que se refere a melhor organização e preservação da estrutura da matriz, os protocolos utilizando Triton X-100 1% (A) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D) apresentaram melhores resultados, os quais podem ser observados por meio da coloração de H&E, Tricômio de Gomori e Alcian Blue, visto que foram capazes de manter a estrutura da matriz intacta, retirando apenas os componentes celulares do tecido (**Fig. 5B, E, G, J, L e O**). Da mesma forma, a ausência de células no tecido foi visualizada na imunofluorescência com DAPI (**Fig. 5Q e T**).

Já quando observamos as imagens do protocolo com apenas com o uso do detergente SDS 0,5% (B), nota-se que a MEC começa a ser degradada, o que pode ser evidenciado pelos espaços/aberturas observados entre as fibras da matriz (**Fig. 5C, H,**

M e R), não mantendo a estrutura desta matriz totalmente preservada como observamos nos protocolos A e D. O uso do SDC 4% utilizado no protocolo C demonstrou um processo de descelularização incompleto, uma vez que ainda é possível observar componentes celulares presentes no tecido, coradas em roxo pela coloração de H&E, em uma quantidade considerável (**Fig. 5D**). Do mesmo modo, é possível observar presença de núcleos celulares evidenciados na marcação com DAPI (**Fig. 5S**). Além disso, notou-se uma leve degradação da MEC por meio das colorações realizadas (**Fig. 5I e N**).

Em relação a preservação de componentes presentes na MEC, observamos os glicosaminoglicanos marcados na coloração de Alcian Blue. Foi possível notar que todos os protocolos apresentaram uma boa preservação desta proteína (**Fig. 5L, M e O**), com exceção do uso do detergente SDC 4% (C), que não apresentou marcação de azul turquesa no seu tecido, indicando a não preservação deste componente no protocolo em questão (**Fig. 5N**).

Figura 5. Análises histológicas da glândula mamária sadia canina, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado nos 4 protocolos utilizados. As imagens mostram uma matriz preservada com o uso do Triton X-100 1% (A), enquanto no SDS 0,5% (B) observa-se a degradação da MEC (estrelas), no uso do SDC 4% (C) há uma descelularização incompleta com presença de componentes celulares (setas) e leve degradação da matriz (estrelas), e já a associação de SDS 0,5% e Triton X-100 1% (D) mostrou uma boa preservação da MEC. Coloração H&E, Tricômio de Gômori, Alcian Blue e DAPI, escala de 100 μ m.

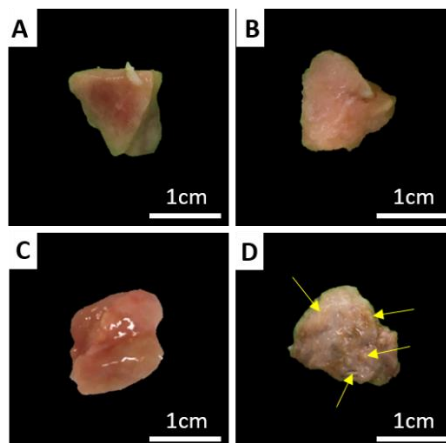


3.2.3 Análise macroscópica dos tumores mamários caninos

A Figura 6 evidencia os fragmentos de neoplasias mamárias dos animais 1, 2, 3 e 4, anterior à realização do processo de descelularização. Nota-se que estes fragmentos

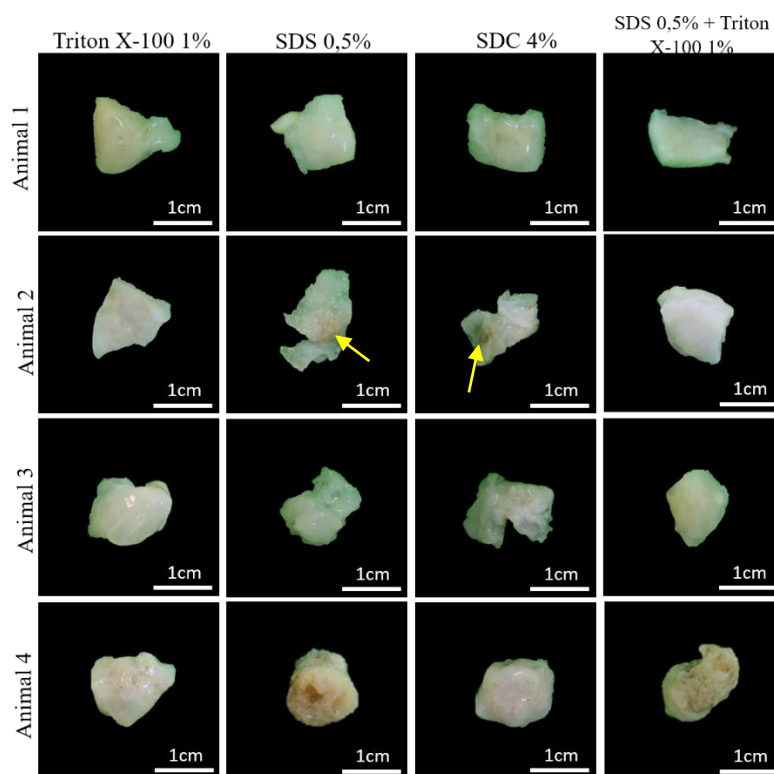
possuem uma coloração avermelhada, de consistência firme, e medindo aproximadamente 1cm³ (**Fig. 6A, B e C**). O fragmento da neoplasia mamária do animal 4 apresenta alguns centros de calcificação em seu interior, o que pode ser observado pelos pontos mais firmes e esbranquiçados no fragmento (**Fig. 6D**).

Figura 6. Fragmentos de tecido mamário neoplásico nativo, anterior ao processo de descclularização. A – Fragmento neoplásico referente ao Animal 1; B - Fragmento neoplásico referente ao Animal 2; C - Fragmento neoplásico referente ao Animal 3; D - Fragmento neoplásico referente ao Animal 4 contendo centros de calcificação (setas).



Abaixo observa-se os resultados macroscópicos do processo de descclularização dos fragmentos de tecido mamário neoplásico (**Fig. 7**). É possível notar que após a realização da descclularização os fragmentos se tornaram mais translúcidos e/ou esbranquiçados. No entanto, os dois fragmentos referentes aos protocolos B e D da neoplasia mamária do animal 4 continham áreas de calcificação em seu interior, o que prejudicou o processo de descclularização destes fragmentos. Portanto, estes fragmentos apresentaram uma descclularização incompleta, visto que o tecido ainda permanece de coloração rósea. Além disso, também visualiza-se pontos de coloração rósea nos fragmentos do animal 2, nos protocolos que foram utilizados SDS 0,5% (B) e SDC 4% (C).

Figura 7. Fragmentos de tecido mamário neoplásico após o processo de descélularização, comparando os diferentes tipos neoplásicos diagnosticados nos animais 1, 2, 3 e 4 com os protocolos Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D) utilizados no processo de descélularização.

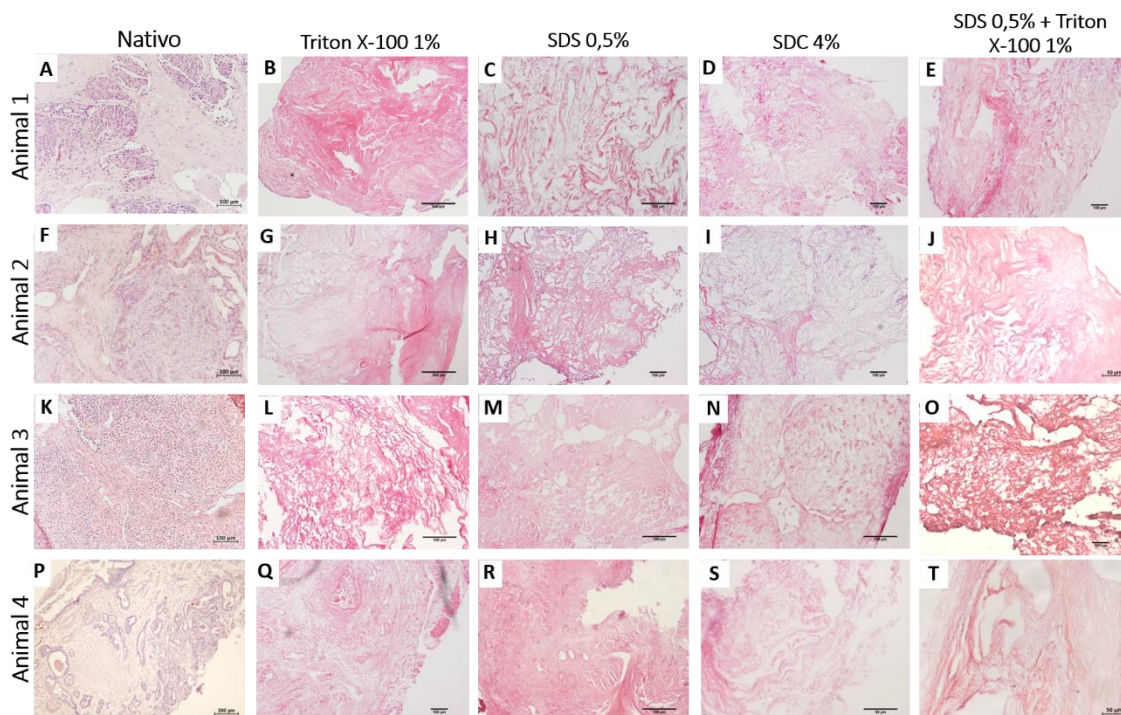


3.2.4 Análise microscópica de tumores mamários caninos

A coloração de H&E permitiu visualizar a presença de células, coradas em roxo, e os demais componentes da MEC corados em rosa no tecido nativo, além de possibilitar o diagnóstico de cada tipo neoplásico dos animais 1, 2, 3 e 4 (**Fig. 8A, F, K e P**). Comparando com o tecido nativo, observa-se que em todos os tipos neoplásicos o protocolo utilizando Triton X-100 1% (A) apresentou boa preservação da estrutura da matriz e ausência de células (**Fig. 8B, G, L e Q**), assim como no protocolo que associou SDS 0,5% e Triton X-100 1% (D) (**Fig. 8E, J, O e T**).

Da mesma forma que observado na glândula mamária sadia, o uso do detergente SDS 0,5% (B) causou maior desintegração da matriz, podendo ser representada pela maior quantidade de espaços na MEC nos animais quando comparamos aos protocolos citados acima (**Fig. 8C, H, M e R**). Quanto ao protocolo C, este apresentou menor degradação da matriz em relação ao protocolo B, entretanto demonstrou uma menor descélularização, visto que ainda são observadas presença de células no tecido (**Fig. 8D, I, N e S**).

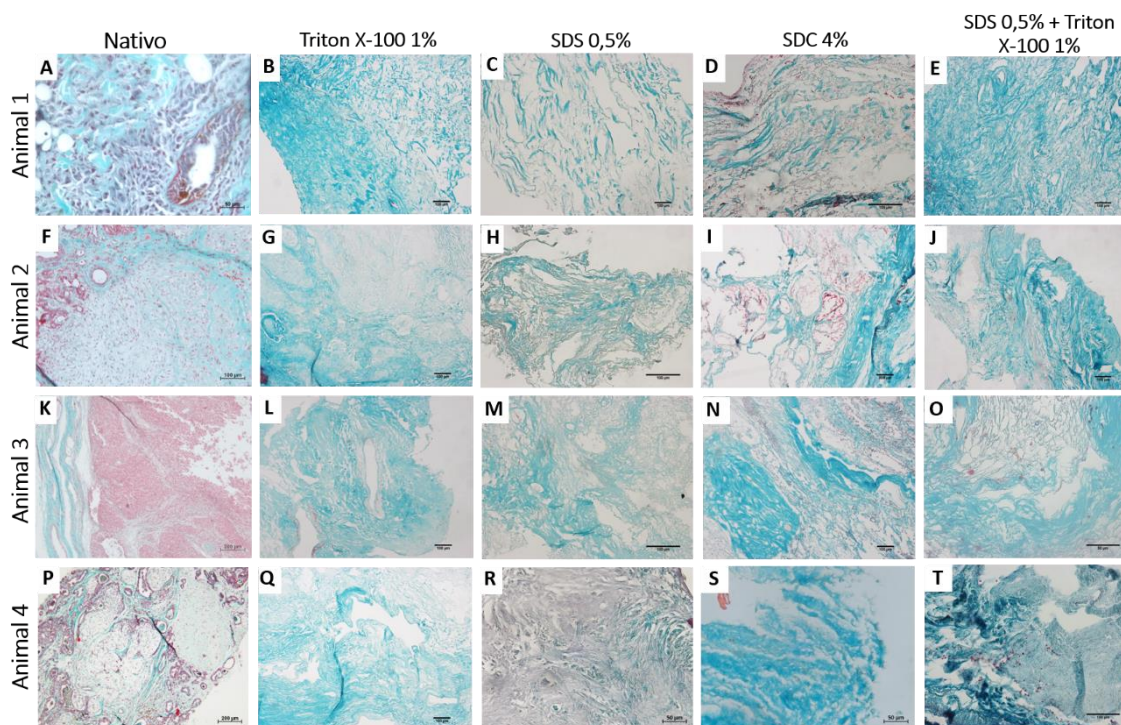
Figura 8. Cortes histológicos de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração H&E, escala de 100 μ m.



Já por meio da coloração de Tricômio de Gomori visualizamos com mais detalhes a dispersão das fibras colágenas, coradas em azul, no tecido neoplásico nativo (**Fig. 9A, F, K e P**) e descelularizado. Assim como na análise de H&E, os protocolos que utilizaram Triton X-100 1% (A) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D) como detergentes mantiveram as fibras de colágeno mais íntegras e preservadas no tecido (**Fig. 9B, E, G, L, Q e T**). Todavia pudemos notar discreta presença de células residuais, coradas em vermelho, no protocolo D dos animais 2 e 3 (**Fig. 9J e O**).

Enquanto com o uso dos detergentes SDS 0,5% (B) e SDC 4% (C) os componentes fibrilares encontravam-se mais esparsados no tecido, demonstrando maior deterioração destes componentes com os detergentes utilizados no processo de descelularização (**Fig. 9C, H, M e R**). Além disso, nota-se que o tecido descelularizado com SDC 4% apresentou quantidade considerável de núcleos celulares, corados em vermelho, sugerindo assim uma descelularização incompleta (**Fig. 9D, I, N e S**).

Figura 9. Fotomicrografia de lâmina histológica de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração Tricômio de Gomori, escala de 100 μ m.



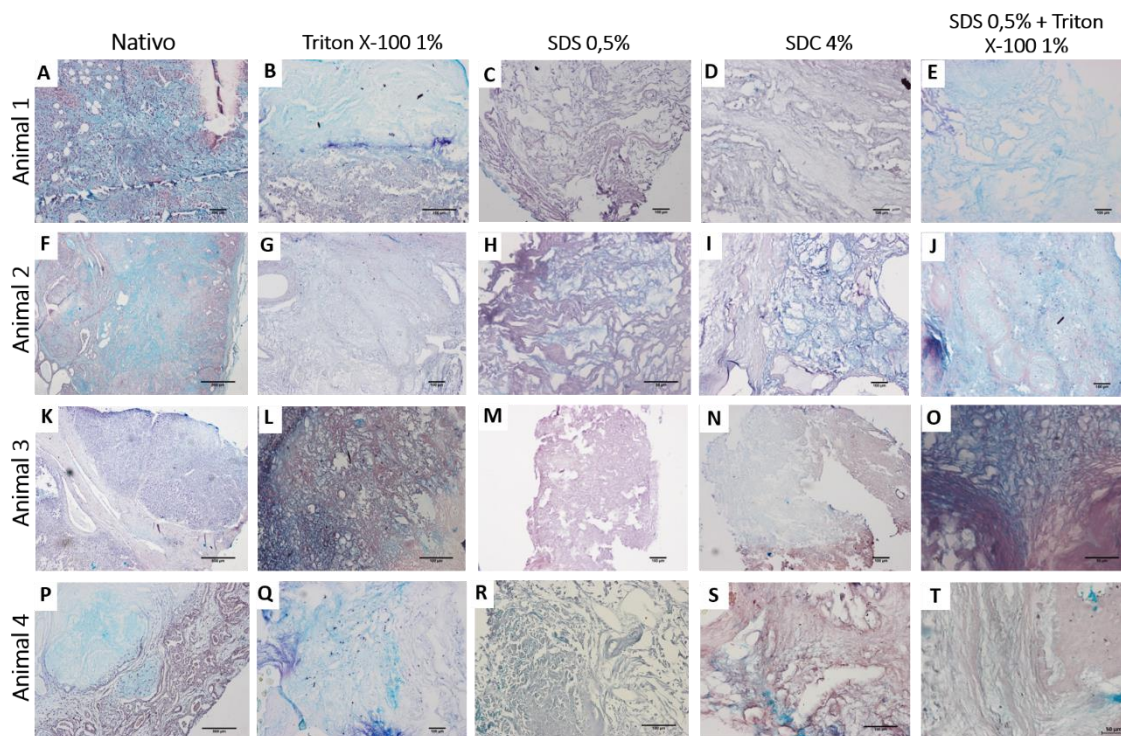
Visando verificar a preservação de outros componentes da matriz, como os GAGs, realizou-se a coloração de Alcian Blue. Pode-se visualizar no tecido nativo que os tipos neoplásicos dos animais 1, 2 e 4 apresentam quantidade moderada de GAGs na matriz, marcados em azul turquesa (**Fig. 10A, F e P**), e já a neoplasia do animal 3 apresenta marcação discreta deste componente na sua MEC (**Fig. 10K**).

Nesta coloração, o protocolo de Triton X-100 1% (A) foi capaz de manter os GAGs mais presentes em sua matriz, com exceção do animal 3, que mesmo no tecido nativo apresentou marcação significativamente baixa desta proteína em sua MEC (**Fig. 10B, G, L e Q**). O protocolo de SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D), da mesma forma, permitiu uma boa preservação de GAGs nas neoplasias mamárias dos animais 1, 2 e 3 (**Fig. 10E, J e O**), contudo quando observamos o tipo neoplásico do animal 4 vimos que não houve preservação deste componente (**Fig. 10T**).

Corroborando com a maior degradação da MEC observadas nas colorações analisadas acima, nesta coloração, mais uma vez, vimos que os protocolos selecionados com o uso de SDS 0,5% (B) e SDC 4% (C) não mantiveram a estrutura da

MEC, visto que houve pouca preservação de GAGs presentes no tecido (**Fig. 10C, D, H, I, M, N, R e S**).

Figura 10. Fotomicrografia de lâmina histológica de tecido mamário neoplásico canino, evidenciando o tecido nativo e o tecido descelularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). Coloração Alcian Blue, escala de 100 µm.



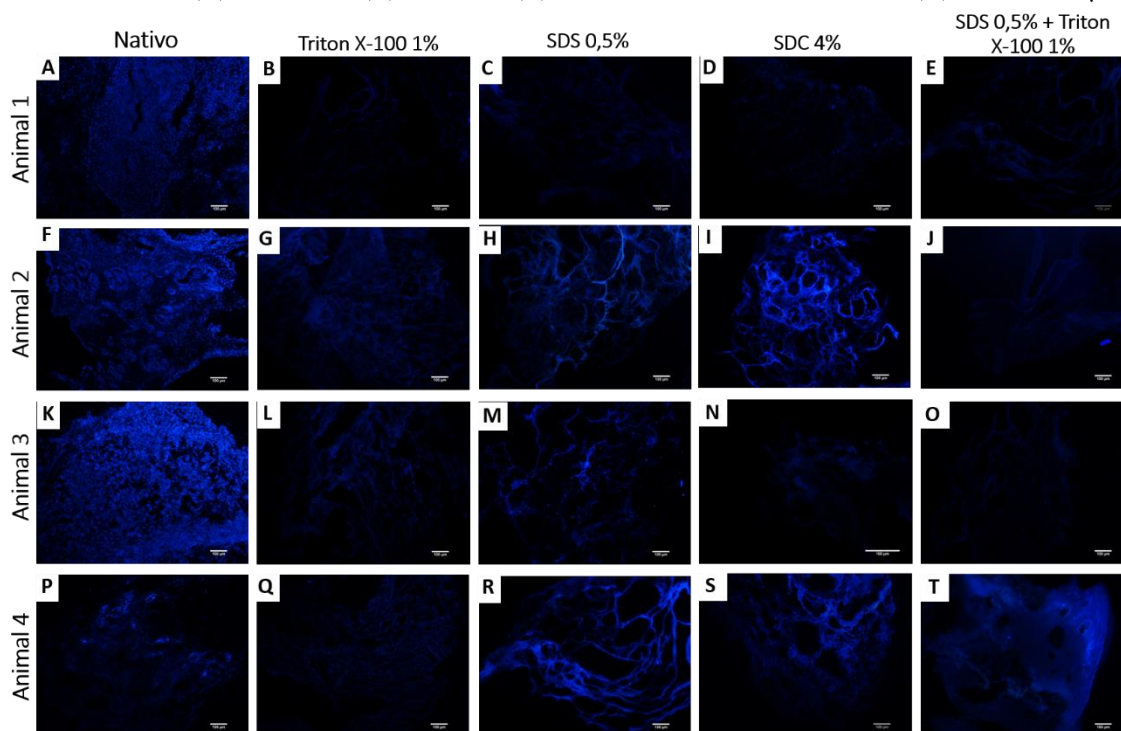
3.2.5 DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol)

A técnica de fluorescência *4',6'-diamino-2-fenil-indol* evidenciou a presença de núcleos celulares presentes em grande quantidade marcados no tecido neoplásico nativo (**Fig. 11A, F, K e P**), o que é esperado devido à presença de células nestes tecidos. Já no tecido descelularizado espera-se a ausência de núcleos celulares, restando apenas a estrutura da matriz extracelular.

Ocorreu ausência completa de componentes celulares no protocolo utilizando apenas o detergente Triton X-100 1% (A), tal dado foi observado em todos os tipos neoplásicos dos 4 animais (**Fig. 11B, G, L e Q**). Já nas análises do protocolo B visualizamos maior marcação de núcleos celular no tecido descelularizado (**Fig. 11C, H, M e R**), da mesma forma que ocorre no protocolo C (**Fig. 11D, I, N e S**). No protocolo D o tecido neoplásico descelularizado dos animais 1, 2 e 3 demonstraram uma descelularização eficaz, com ausência de núcleos celulares marcados pela imunofluorescência com DAPI (**Fig. 11E, J e O**), porém o fragmento do animal 4 que

continha focos de calcificação não obteve uma boa descellularização, devido a marcação moderada de componentes celulares no tecido (**Fig. 11T**).

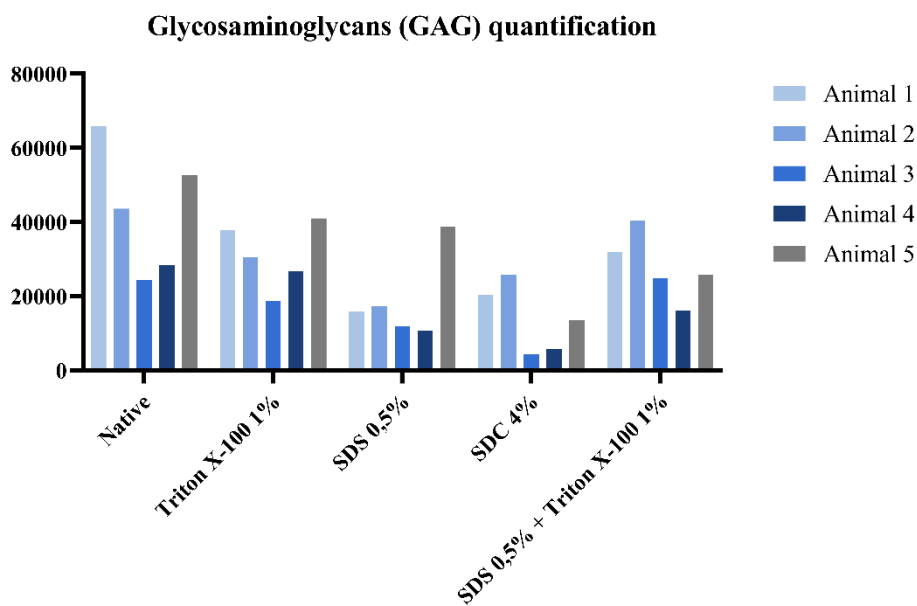
Figura 11. Marcação de núcleos celulares por meio da técnica de fluorescência *4',6'-diamino-2-fenil-indol* nos tecidos neoplásicos nativo e o tecido descellularizado, incluindo os protocolos com o uso de Triton X-100 1% (A), SDS 0,5% (B), SDC 4% (C) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D). DAPI, 100 μ m.



3.2.6 Quantificação de GAGs

Para melhor precisão dos resultados realizou-se a quantificação de GAGs, baseada na coloração de Alcian Blue. Pode-se observar que os protocolos referentes ao uso de SDS 0,5% (B) e SDC 4% (C) mostraram menor preservação de GAGs em sua matriz, visto que as quantidades desta proteína nestes protocolos foram significativamente menores do que apresentado no tecido nativo. Já o uso dos detergentes Triton X-100 1% (A) e SDS 0,5% + Triton X-100 1% (D) revelaram melhor preservação deste componente na MEC, evidenciando resultados similares à quantidade desta proteína no tecido nativo (**Gráfico 1**).

Gráfico 1. Gráfico revelando a quantificação de GAGs presentes no tecido mamário neoplásico nativo e descelularizado, comparando os diferentes protocolos realizados com o tecido nativo dos tumores.



4. DISCUSSÃO

A MEC desempenha papéis importantes na iniciação e progressão do câncer, visto que se altera em diferentes estágios de malignidade, se remodelando dinamicamente a fim de regular funções diversas das células tumorais, tais como sobrevivência e crescimento celular (HOSHIBA; TANAKA, 2016; KHARAISHVILI et al., 2011). Assim como neste estudo, diversos estudos foram realizados utilizando matrizes descelularizadas, buscando uma maior compreensão da atuação da MEC no câncer e o desenvolvimento de uma MEC reconstituída *in vitro*, a qual mimetiza a MEC nativa (BADYLAK, 2007; HOSHIBA, 2017, 2019; TAYLOR et al., 2018).

As matrizes extracelulares descelularizadas vem sendo empregadas como biomateriais para desenvolver *scaffolds*/hidrogéis ou biotinas, os quais suportam o crescimento de células em modelos 3D *in vitro*, aplicação relevante na área de pesquisa de modelos de câncer 3D *in vitro* (MASON et al., 2017; YI et al., 2019). Este estudo aborda 4 protocolos diferentes de descelularização de tecido mamário sadio e neoplasias mamárias caninas, levando em consideração a vasta possibilidade de agentes e métodos que podem ser utilizados para a realização deste processo.

A fim de se obter um modelo ideal de estudo da MEC, favorecendo posteriores pesquisas na área da oncologia, principalmente quando nos referimos a culturas em

modelo 3D, é necessário otimizar e aprimorar os protocolos de descclularização. Um protocolo ideal deve remover os componentes celular de um tecido, contendo < 50ng de DNA, e ao mesmo tempo preservar a estrutura da MEC, preservando ao máximo os seus componentes, tais como colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; LIU et al., 2019).

Aqui demonstramos que a utilização única do detergente SDS 0,5% acarretou maior dano para a MEC, tanto do tecido mamário sadio quanto do tecido neoplásico. As fibras presentes na matriz deste fragmento descclularizado se apresentaram mais esparsadas quando visualizadas no tecido nativo, sendo possível observar algumas aberturas na MEC por meio das colorações de H&E e Tricômio de Gomori que foram realizadas. Isto pode ter ocorrido devido o SDS ser considerado um detergente iônico forte, o qual pode romper completamente as membranas celulares, porém ao mesmo tempo é capaz de desnaturar proteínas e alterar a estrutura nativa da MEC (CHEN et al., 2004; KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015).

Lü et al. (2014) realizou o processo de descclularização com amostras de tumores de adenocarcinoma pulmonar humano, e da mesma forma, verificaram que as amostras descclularizadas com SDS 0,5% danificaram a matriz, já que o tecido descclularizado apresentava distribuição mais esparsa das fibras colágenas e menor presença de GAGs em comparação ao tecido nativo. Assim como neste estudo, a quantificação de GAGs demonstrou menores quantidades desta proteína nos tecidos descclularizados com SDS 0,5%, ou seja, menor preservação da mesma no tecido. Da mesma forma, outros estudo relataram reduções significantes de componentes da MEC ao utilizar o detergente SDS, além de uma diminuição em 50% de GAGs (REING et al., 2010; UYGUN et al., 2010).

Entretanto, quando nos referimos a tumores de mama em humanos, Landberg et al. (2020) e Leiva et al. (2021) descreveram bons resultados de descclularização utilizando a concentração de SDS 0,1% em um período de tempo menor, de apenas 6 horas, e também com menores tamanhos de fragmentos tumorais. No estudo em questão, quando utilizamos o protocolo D, que consistia no uso do SDS por um período de tempo mais curto e associando-o com o detergente Triton X-100 1% pudemos notar maior integridade da MEC, com uma maior preservação de seus componentes, assim como mostrado pelo gráfico de quantificação de GAGs.

Wishart et al. (2020) realizaram o processo de descclularização em tumores de mama humanos utilizando os detergentes SDS 0,1% seguido de solução Triton X-100 0,05%, com lavagem em água destilada para remoção de detergente residual e de células que não se desprenderam dos tecidos, e com este protocolo descreveu bons resultados e uma descclularização bem-sucedida.

O Triton X-100, um detergente não iônico muito utilizado em processos de descclularização é caracterizado por romper as ligações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína, mantendo as ligações de proteínas intactas, e sendo indicado quando o enfoque são as proteínas da MEC (MENDIBIL et al., 2020; TAVASSOLI et al., 2015). Adotado neste estudo, o uso do detergente Triton X-100 1% demonstrou ótimos resultados para descclularização de tecido mamário sadio e acometido com tumores na espécie canina, observados por meio das colorações histológicas, obtendo uma boa descclularização, com ausência de componentes celulares, e conservação dos componentes da MEC, como colágeno e glicosaminoglicano.

Outros estudos relataram descclularização eficaz com o uso do detergente Triton X-100, sendo apontado como o que apresentou o melhor efeito em ligamentos, não degradando colágenos e proteínas totais, e causando menor depleção de GAG quando comparado aos demais detergentes. Além disso, sua eficácia foi demonstrada em tecidos como córnea, pulmão, válvula aórtica, ligamentos e pericárdio (CHOI et al., 2010; GRAUSS et al., 2003; MENDOZA-NOVELO et al., 2011; MISHRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; VAVKEN; JOSHI; MURRAY, 2009).

Para tumores de mama em humanos um outro tipo de detergente vem demonstrado bons resultados de descclularização, que consiste na solução de lauril éter sulfato de sódio (SLES), a qual foi descrita pela primeira vez nestes tumores (JIN et al., 2019; LIU et al., 2019). Tem como característica propriedades suaves, com excelente desempenho de detergência e dispersão, e inicialmente já havia sido relatado o seu uso em coração e pulmão ratos com um processo de descclularização otimizado (KAWASAKI et al., 2015; MA et al., 2018).

O tecido mamário apresenta uma composição bastante heterogênea, e em alguns casos, as neoplasias mamárias podem apresentar tecido cartilaginoso ou ósseo em sua constituição, devido ao desenvolvimento de metaplasia (BRODEY; GOLDSCHMIDT;

ROSZEL, 1983), o que foi observado na neoplasia do Animal 4. A presença de tecido ósseo e/ou cartilaginoso pode dificultar o processo de descelularização, e por isso, os dois fragmentos que continham a presença destes tecidos permaneceram em EDTA durante dois meses.

Segundo Neves et al. (2011) o EDTA, considerado como um quelante com pH neutro, necessita de período mais longos para obter sua completa descalcificação do que os ácidos tradicionalmente utilizados, como o ácido clorídrico e nítrico, contudo, ao contrário destes ácidos, o EDTA apresenta melhores resultados morfológicos. Entretanto, neste trabalho estes fragmentos específicos não demonstraram uma boa descelularização, já que ainda continham resquícios de componentes celulares.

5. CONCLUSÃO

Este estudo revelou que os métodos adotados para o processo de descelularização no protocolo A e D foram eficazes para retirada dos componentes celulares do tecido, mantendo a organização e estrutura da MEC preservada, bem como os seus componentes presentes no tecido. Os dados apresentados suportam a utilização destes protocolos para a criação de *scaffolds* e andaimes 3D com os tipos de carcinomas mamários utilizados neste estudo, podendo ser relevantes para pesquisas pré-clínicas em tumores mamários desta espécie, e possivelmente contribuindo para o estudo do câncer de mama na medicina humana, tendo em vista as similaridades entre as neoplasias das duas espécies.

CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR DE GLÂNDULA MAMÁRIA SADIÁ E TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

RESUMO: Na glândula mamária sadia, os componentes da matriz extracelular (MEC), assim como as proteínas, provem suporte e homeostase para o tecido, no entanto em alterações patológicas como o câncer de mama, eles podem fornecer suporte e influenciar no desenvolvimento e na progressão de neoplasias. As neoplasias mamárias em fêmeas caninas representam grande parte do diagnóstico nesta espécie, sendo consideradas malignas em até 50% dos casos. Diante disso, este estudo visou identificar alterações na estrutura e na organização da MEC dos diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias que acometem os cães, comparando-os com a matriz da glândula mamária sadia. Para isso, realizou-se o processo de descclularização de 10 amostras de tumores de mama, e 1 sem sinal de acometimento desta glândula, e procedeu-se análises histológicas, de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e imuno-histoquímica tanto no tecido nativo como no tecido descclularizado. Os resultados revelaram uma diminuição de colágeno nas regiões intratumorais, principalmente no grau histológico III, além de fibras colágenas mais espessas e unidas do que em relação a glândula mamária sadia. A marcação com MMP-9 indicou possível correlação com a degradação de colágeno tipo III e elastina, sendo observada com maior expressão nos tumores mamários de alto grau. Este estudo evidenciou alterações estruturais importantes que ocorrem na MEC na presença de neoplasias mamárias em cães, as quais são relevantes para o desenvolvimento de tumores. A descrição destas alterações pode contribuir para a realização de nas pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas terapias com ênfase nos componentes da matriz em tumores mamários da espécie canina. Além disso, a descclularização se mostrou um método valioso para o estudo focado na estrutura e organização da MEC, evidenciando apenas os seus componentes.

Palavras-chave: tecido mamário, matriz extracelular, descclularização, colágeno, cão.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são consideradas o tipo neoplásico de maior acometimento em fêmeas caninas, e dentro a grande variedade de classificações de tumores mamários, aproximadamente 50% são classificados como malignos. Pode-se associar a esta taxa o diagnóstico tardio, o qual compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivência dos animais. Dependendo do subtipo, estágio e grau, os tumores de mama podem estar associados a um risco significativo de recorrência local e alto índice de metástase (ANDRADE et al., 2010; EGENVALL et al., 2005; NUNES et al., 2018).

A quimioterapia e a radioterapia representam opções de tratamento para o câncer de mama, no entanto possuem limitações, incluindo os diversos efeitos colaterais em cães e o acesso limitado na medicina veterinária à radioterapia (CASSALI et al., 2020; CUNHA et al., 2017; STEPHENS, 2019). Apesar dos avanços na pesquisa e

desenvolvimento na área da oncologia, tem-se descrito que cerca de 95% dos medicamentos oncológicos na fase de ensaios clínicos não são aprovados. Parte desta falha envolve a falta de modelos pré-clínicos adequados que representem a complexidade e o microambiente do câncer (KOLA; LANDIS, 2004; NGUYEN et al., 2013). Dessa forma, o entendimento da relação das células tumorais com o microambiente é essencial para o desenvolvimento de novas terapias que possam prevenir ou controlar os tumores de mama (LV et al., 2021).

Na medicina humana, já é amplamente reconhecido a importância do microambiente tumoral para o desenvolvimento do câncer, enquanto na medicina veterinária este tema vem sendo abordado recentemente (BISSELL; HINES, 2011; PEIN; OSKARSSON, 2015). A MEC contempla uma rede dinâmica que envolve as células dentro dos tecidos, sendo composta por diversas proteínas que formam sua estrutura, bem como o colágeno, lamininas, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, além de enzimas de remodelação. Durante a progressão do câncer, estas proteínas são desreguladas, acarretando reorganização, remodelação e inflamação na MEC, que levam a invasão tumoral e ocorrência de metástase no microambiente tumoral (MUSCHLER; STREULI, 2010; OSKARSSON, 2013; YANG; BAHCECIOGLU; ZORLUTUNA, 2020).

Em tumores mamários caninos foi descrita a degradação de determinados componentes presentes na MEC. O colágeno, por exemplo, é diminuído no microambiente tumoral, além de sofrer alterações estruturais na presença de malignidade, em que suas fibras se encontram mais alinhadas, influenciando na modulação do comportamento nas neoplasias, bem como no desenvolvimento de metástases. As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que atuam na degradação de proteínas da MEC, as quais são altamente ativas em tecidos malignos em comparação aos tecidos saudáveis. Sua ação já foi relatada em câncer de mama em humanos, sendo associadas a proliferação, invasão, metástase e angiogênese (CASE et al., 2017; FALZON; PEARSON; MURISON, 2008; GARCIA et al., 2021; TUER et al., 2011).

Neste contexto, a bioengenharia de tecidos tem apresentado resultados promissores no que se refere a novas perspectivas de estratégias terapêuticas. O processo de descelularização visa remover os componentes celulares do tecido, resultando apenas em uma MEC remanescente. Este processo pode ser realizado com diferentes agentes sejam eles químicos, biológicos ou físicos, e pode resultar em scaffolds 3D para testes de novas terapias e, possivelmente em um novo método para o

estudo aprofundado da MEC (JIN et al., 2019; KHARAISHVILI et al., 2011; LEIVA et al., 2021; MENDIBIL et al., 2020).

Considerando a importância da MEC para progressão das neoplasias mamárias e a escassez de estudos envolvendo o microambiente tumoral na espécie canina, este estudo visa realizar verificar alterações na estrutura e nos componentes da matriz extracelular em tecidos mamários neoplásicos de diferentes classificações histológicas, tendo como comparação a matriz de um tecido mamário sadio. Além disso, avaliar se a descclularização é um método eficiente para uma avaliação com ênfase na apenas MEC de tumores mamários caninos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aprovação no Comitê de Ética

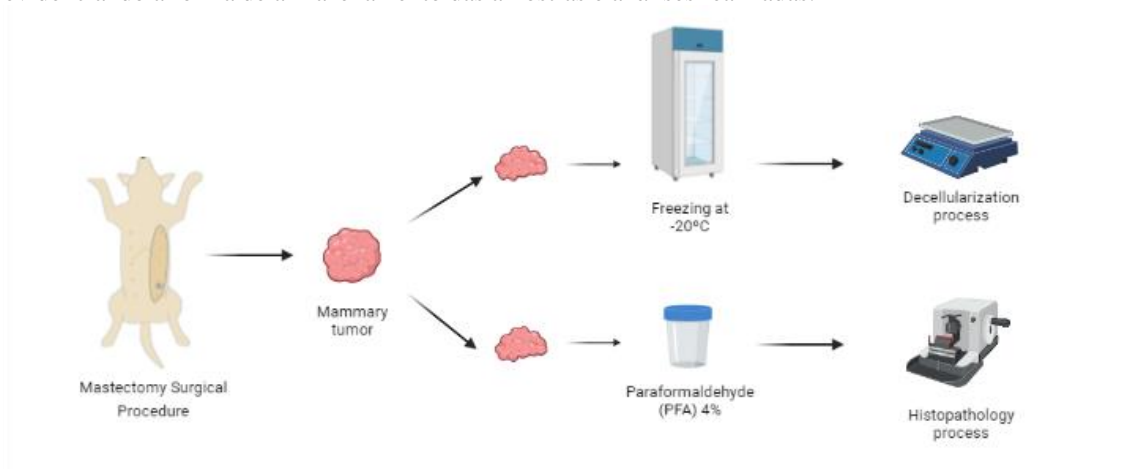
Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMVZ) número 3966081220.

2.2 Coleta de amostras

A coleta de amostras de tecido mamário foi proveniente de fêmeas caninas que vieram à óbito ou foram submetidas ao procedimento de mastectomia em decorrência da neoplasia mamária. Nenhum animal foi submetido a cirurgia para a realização deste projeto. Os procedimentos foram realizados de acordo com a conduta de médicos veterinários do Hospital Escola Veterinário de Jaguariúna (HEV- UNIFAJ). O tecido mamário utilizado neste estudo foi autorizado pelo tutor por meio da autorização de uso para fins didáticos.

Foram coletadas amostras de 10 cadelas acometidas com tumor de mama e 2 sem sinal de acometimento desta glândula, ambos os tecidos foram divididos em duas partes, sendo a primeira armazenada em paraformaldeído (PFA) a 4% para posterior caracterização do tipo neoplásico por meio do processo histológico; enquanto a segunda foi congelada à -20°C para realização do processo de descclularização. As amostras de tecido mamário sadio foram coletadas da glândula mamária abdominal caudal (M4) e inguinal (M5) (**Fig. 1**).

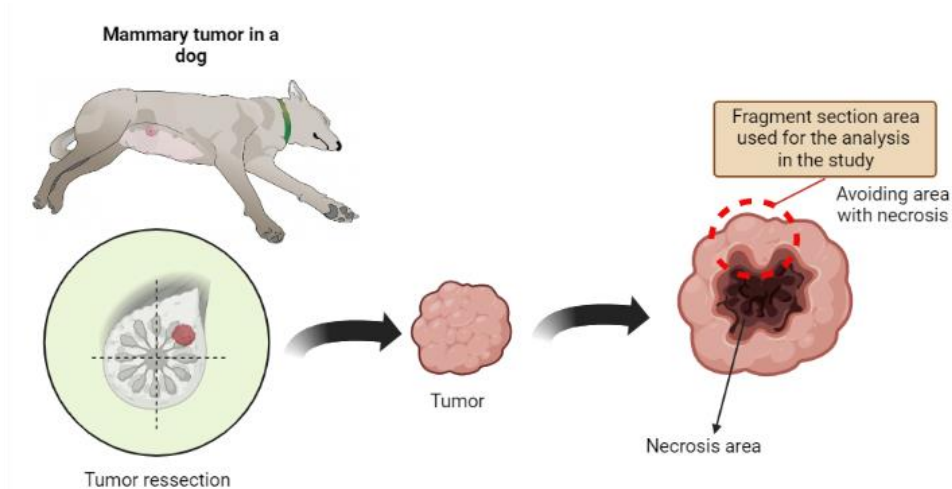
Figura 1: Resumo esquemático da coleta das amostras de tecido mamário sadio e neoplásico, evidenciando a forma de armazenamento das amostras e análises realizadas.



2.3 Análise histopatológica

Após a coleta da amostra, foi realizada a fixação dos tecidos por imersão em PFA 4%, e após 48 horas foi substituído pela solução de álcool 70%. Para início do processamento histológico foram realizados cortes de pequenos fragmentos com auxílio de uma lâmina de bisturi, sendo selecionadas regiões próximas a borda do tumor, evitando áreas com necrose (ARAÚJO; CASSALI, 2017) (**Fig. 2**).

Figura 2: Desenho esquemático de local de coleta de amostras dos fragmentos de tumores mamários da espécie canina.



Em seguida, os fragmentos foram colocados em cassetes e permaneceram em uma mesa agitadora, os quais foram submetidos ao processo de desidratação, isto é, uma série de banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e 100%); e diafanização, por meio de banhos de xilol por aproximadamente uma hora. Logo após,

procedeu-se a impregnação em parafina e posterior inclusão dos fragmentos nos blocos de parafina.

Os cortes foram realizados na espessura de 5 micrômetros (μm) em micrótomo automático (Leica, RM2165, Alemanha) e colocados em lâminas histológicas para posterior desparafinização em estufa à 60°C durante o período de duas horas. Com isso, iniciou-se o procedimento de coloração das lâminas, onde foram selecionadas as colorações de Hematoxilina e Eosina (HE), Tricômio de Gomori, Alcian Blue - Histokit Alcian Blue Ph 2,5 (EP-12-20018) e Picrosísirus – Histokit Picrosísirus-Hematoxilina (EP-11-20011), sendo os dois últimos realizado de acordo com instruções do fabricante.

2.4 Processo de descelularização

Para a realização do processo de descelularização, as amostras de tecido mamário sadio e neoplásico foram cortadas em pequenos fragmentos (2x2cm) e lavados durante 2 horas em água destilada. Após, os fragmentos permaneceram por 72 horas no detergente Triton X-100 1% juntamente com EDTA (5Mm), realizando trocas da mesma solução duas vezes ao dia. Estes fragmentos foram mantidos em temperatura ambiente e em rotação orbital a 250 rpm. Por fim, os fragmentos foram lavados em água destilada durante 48 horas, com realização de trocas quatro vezes ao dia, a fim de retirar o excesso de detergente e células residuais.

2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para realização desta técnica, as amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovisk durante 48 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada por quatro ciclos de 5 minutos cada, e armazenadas em álcool 70%. Finalmente, os fragmentos foram submetidos a desidratação para secagem no ponto crítico (Balzers CPD 020), e o material foi colocado em suporte metálico dourado ("sputtering" Emitech K550). Os dados foram coletados em microscópio eletrônico ME Leo 435 VP no CADI-FMVZ USP.

2.6 Quantificação de GAGs e colágenos

Todas as imagens foram quantificadas por meio da utilização do Software ImageJ – Color_Deconvolution2 e Threshold_Colour. Foram adquiridas 10 imagens de diferentes regiões do tecido utilizando o Microscópio de Luz (Leica, RM2165, Alemanha) em uma lente objetiva de 20x. A marcação de azul turquesa na coloração de Alcian Blue é indicativa de presença de GAGs/mucinas ácidas, esta coloração foi separada pelo

ImageJ por meio de limiares manuais de matiz, saturação e valores de brilho, e o conteúdo foi quantificado por intensidade média de azul turquesa por área de tecido.

Da mesma forma, foram adquiridas imagens utilizando a coloração de Picrosúrus, e foram fotografadas utilizando microscopia de campo claro e um filtro polarizado circular, visto que a birrefringência sob a luz polarizada é altamente específica para colágeno (BAUMAN et al., 2014; RICH et al., 2017).

2.7 Imuno-histoquímica

Para a técnica de imuno-histoquímica, inicialmente as lâminas foram deixadas na estufa a 60°C overnight, seguida de sua desparafinização e hidratação com o uso de Xilol e Álcool em concentração decrescente. Na etapa de recuperação antigênica as lâminas foram submersas em uma solução tampão Citrato-Fosfato 0,5 M (Sigma Aldrich; #P4809-100TAB) e mantidas em panela de pressão a 100°C por 5 minutos. Após retirar da panela, as lâminas esfriaram em solução de PBS 1X durante 5 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio com peroxidase (endógena) (Kit Dako) na ausência de luz, e após o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com BSA 2% por um período de 30 minutos.

Os anticorpos primários anti-colágeno III (PA1-28870, 1:100; Invitrogen), anti-elastina (ab9519, 1:250, Abcam), anti-MMP9 (ab76003, 1:250, Abcam) foram incubados e deixados durante a noite e mantidos em geladeira e uma câmara úmida. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com solução BSA 1%, e foram incubados os anticorpos secundários (Dako avance HRPLink) em câmara úmida por 30 minutos. Por fim, procedeu-se o passo de revelação, realizado por meio de DAB1 e substrato Buffer, durante aproximadamente 5 minutos, até observar a coloração marrom nos cortes. Após, realizou-se a contracoloração com Hematoxilina e procedeu-se a desidratação dos cortes. Por fim, as lâminas foram montadas e visualizadas em microscópio eletrônico de luz (Leica, RM2165, Alemanha).

3. RESULTADOS

A Tabela 1 evidencia os dados clínicos dos pacientes selecionados para este estudo, que incluem raça, sexo, idade, fêmea castrada ou inteira, presença ou não de obesidade, localização do tumor, além do diagnóstico histopatológico de cada neoplasia mamária. Dentre as 10 amostras analisadas, 8 foram diagnosticadas histologicamente como carcinoma mamário, enquanto 1 como neoplasia fusocelular e 1 sendo considerada

apenas uma hiperplasia lobular regular. Quanto ao grau histológico dos carcinomas mamários, 5 casos foram classificados com grau histológico I, 2 casos com grau histológico II e somente 1 caso com grau histológico III.

Nota-se que a idade dos pacientes variou de 7 a 19 anos, apresentando uma idade média de 11,8 anos, com uma predominância de animais idosos, acima de 10 anos de idade. Dentre o total de casos, 6 fêmeas haviam realizado o procedimento de castração, ao passo que 4 foram descritas como não castradas. Além disso, foi avaliado o tópico obesidade no estudo, em que somente 2 fêmeas se encontravam acima do peso ideal para o seu porte. Na grande maioria das fêmeas acometidas com neoplasia mamária deste estudo, o tumor se localizava nas últimas duas glândulas da cadeia mamária do cão, sendo elas a glândula mamária abdominal caudal e a glândula mamária inguinal.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes selecionados para o estudo associados ao diagnóstico histopatológico.

Animal	Raça	Sexo	Idade	OSH	Obesida de	Mama acometida	Diagnóstico histopatológico
Animal 1	Pinscher	F	19 anos	Não	Não	M5 entre o antímero direito e esquerdo	Comedocarcinoma mamário, grau II
Animal 2	Poodle	F	11 anos	Não	Não	M2 antímero esquerdo	Carcinoma mamário complexo, grau I
Animal 3	Labrador	F	7 anos	Não	Sim	M4 antímero direito	Carcinoma mamário sólido, grau III
Animal 4	Cocker	F	12 anos	Sim	Sim	M5 antímero direito	Carcinoma mamário tubular simples, grau I
Animal 5	Dashshund	F	15 anos	Sim	Não	M4 não ulcerado, antímero esquerdo	Carcinoma mamário tubular simples, grau I
Animal 6	Cane Corso	F	9 anos	Sim	Não	M4	Hiperplasia lobular regular
Animal 7	SRD	F	13 anos	Não	Não	M5	Neoplasia fusocelular
Animal 8	SRD	F	7 anos	Não	Não	M4	Comedocarcinoma mamário, grau II
Animal 9	SRD	F	10	Não	Não	M4 e M5 não	Carcinoma mamário

			anos			ulcerado, antímerno direito	tubulopapilar, grau I
Animal 10	SRD	F	15 anos	Sim	Não	M3 não ulcerado, antímerno direito	Carcinoma mamário tubular simples, grau I
Animal 11	Teckel	F	10 anos	Não	Não	M4 e M5	Glândula mamária sadia

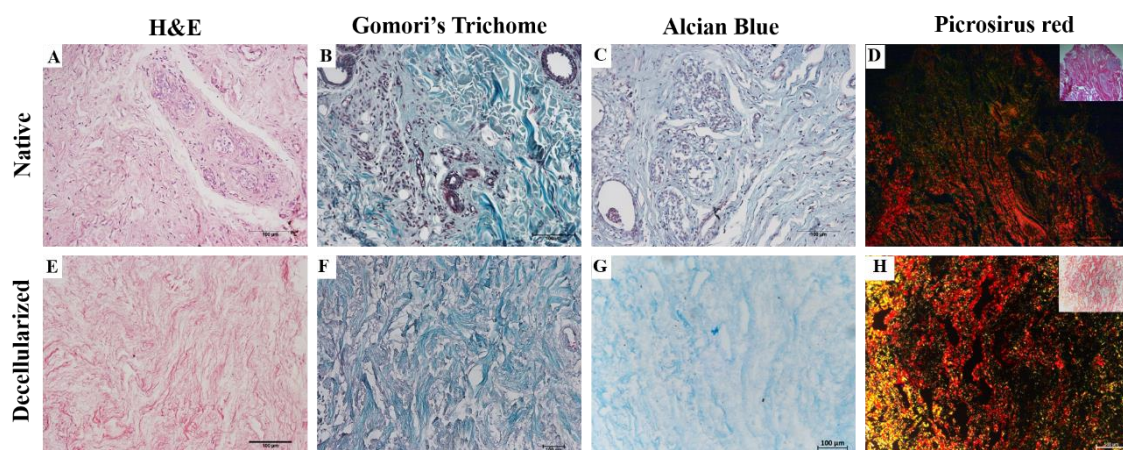
3.1 Caracterização da Matriz Extracelular da glândula mamária sadia

3.1.1 Análises histológicas e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O tecido mamário sadio se apresenta com uma grande quantidade de estroma fibroso ao redor dos lóbulos e ductos mamários (**Fig. 3A**), e os componentes fibrilares na matriz podem ser visualizados em azul na coloração de Tricômio de gomori (**Fig. 3B**). Além disso, as fibras colágenas são observadas em grande quantidade no tecido mamário (**Fig 3D**), pela marcação de picrossírus polarizado. A matriz da glândula mamária sadia também possui glicosaminoglicanos presentes, evidenciados em azul (**Fig. 3C**).

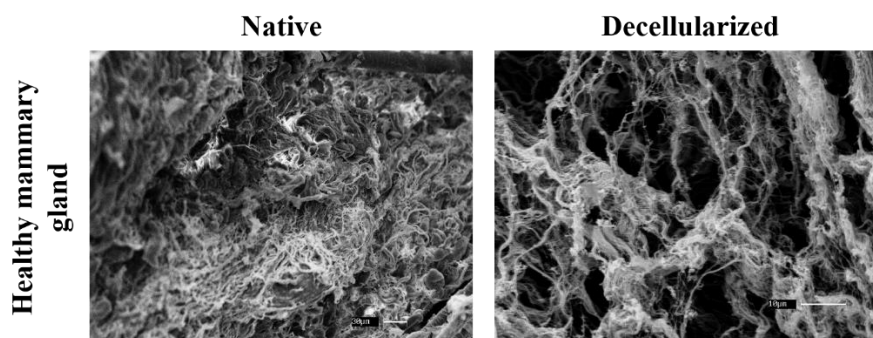
Da mesma forma, observamos a matriz da glândula mamária sadia no tecido descelularizado, contudo, podemos visualizá-la com mais detalhes, devido à ausência de células no tecido. A matriz se caracteriza por grande quantidade de fibras em sua estrutura, dispersas no tecido e de espessura fina e moderada (**Fig. 3E, F, G, H e I**).

Figura 3. Análises histológicas com as colorações de H&E, Tricômio de Gomori, Alcian Blue e Picrossírus red, evidenciando o tecido mamário sadio nativo e descelularizado.



Nota-se a estrutura e organização da glândula mamária por meio da MEV, na ausência dos componentes celulares a MEC revela os componentes fibrilares organizados de maneira esparsada e com fibras mais finas (**Fig. 4**)

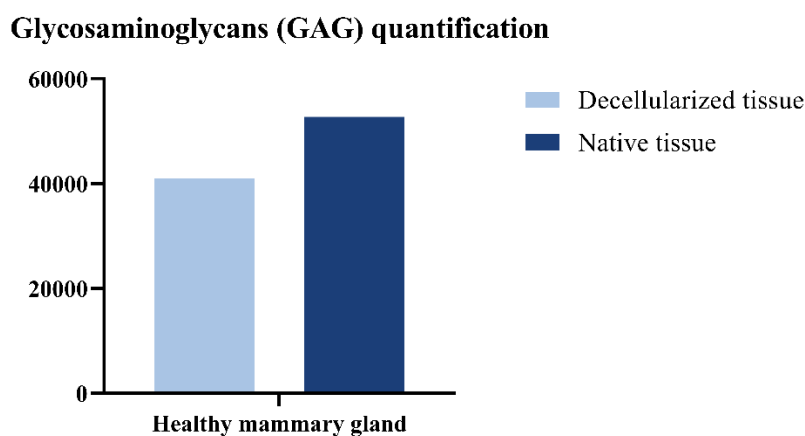
Figura 4. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a estrutura e organização do tecido mamário sadio nativo e descelularizado.



3.1.2 Quantificação de Glicosaminoglicanos totais

O gráfico de quantificação de glicosaminoglicanos revelou maior quantidade desta proteína no tecido mamário nativo do que no tecido descelularizado, o que é esperado devido a leve perda de alguns componentes no processo de descelularização. Apesar disso, a glândula mamária sadia apresentou grande quantidade desta proteína presente em sua matriz (**Gráfico 1**).

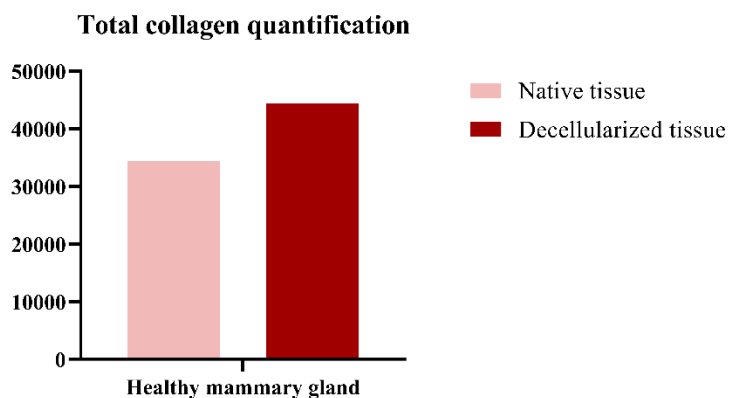
Gráfico 1. Gráfico indicando a presença de glicosaminoglicanos no tecido mamário sadio nativo e descelularizado.



3.1.3 Quantificação de colágenos totais

Com relação a quantificação de colágenos totais notamos maior quantidade destas fibras no tecido descelularizado em comparação ao tecido nativo. De maneira geral o tecido apresentou uma quantidade significativa de fibras colágenas em sua matriz (**Gráfico 2**).

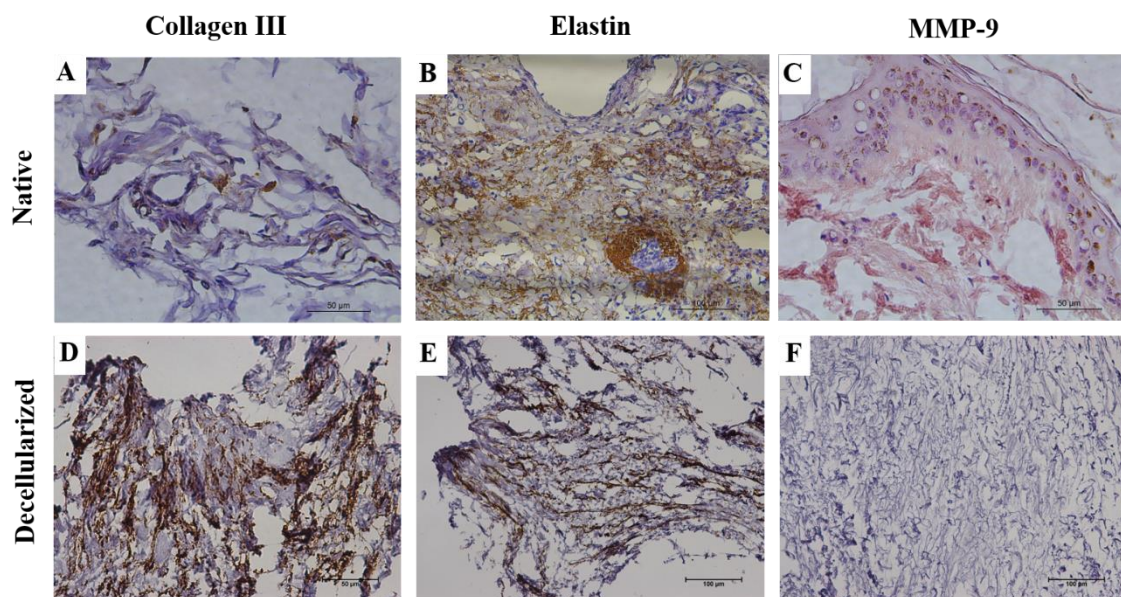
Gráfico 2. Gráfico indicando a presença de colágenos totais no tecido mamário sadio nativo e descelularizado.



3.1.4 Imuno-histoquímica

Quanto a análise de imuno-histoquímica da glândula mamária, o tecido nativo revelou maior marcação de elastina ao redor dos alvéolos mamários, enquanto pouca expressão de colágeno tipo III foi observada. Já o tecido descelularizado mostrou maior marcação de colágeno III e elastina do que em relação ao tecido nativo. Com relação a MMP-9 houve leve expressão no tecido mamário nativo, e ausência de marcação desta enzima no tecido descelularizado (**Fig. 5**).

Figura 5. Análise de imuno-histoquímica da glândula mamária sadia com expressão positiva de elastina e colágeno tipo III (nativo e descelularizado), e leve expressão de MMP-9 no tecido nativo, e expressão negativa no tecido descelularizado.



3.4 Caracterização da Matriz Extracelular de tumores mamários caninos

3.4.1 Coloração de H&E

As análises histológicas com a coloração de H&E demonstraram as diferentes classificações de neoplasias mamárias na sua forma nativa e descelularizada. O animal 1 apresentou o comedocarcinoma mamário (grau II) constituído por proliferação neoplásica multilobular, com crescimento invasivo, e região central de necrose dentro dos lóbulos sólidos (comedonecrose) (**Fig. 6A**). No tecido descelularizado, o estroma fibroso apresenta-se em quantidade moderada, com componentes mais densos e bem definidos, e com espaços em seu interior devido à ausência dos grupamentos de células (**Fig. 6B**). O carcinoma mamário complexo (grau I) do animal 2 apresentou proliferação neoplásica ausente de delimitação, com túbulos mostrando crescimento infiltrativo no estroma, onde as células se organizam em estruturas tubulares, e são entremeadas por grande quantidade de estroma fibroso com focos de hialinização de colágeno (**Fig. 6C**). A MEC apresentou-se contínua e intacta, com componentes menos densos no tecido descelularizado (**Fig. 6D**).

A figura 6E mostra o carcinoma mamário sólido (grau III) caracterizado por uma proliferação neoplásica pouco delimitada, não encapsulada e de crescimento infiltrativo (**Fig. 6E**). As células organizam-se em tapete sólido, entremeadas por discreta quantidade de estroma fibrovascular. Este estroma é observado em menor quantidade do

que nas outras neoplasias e encontra-se de forma mais desorganizadas, com os seus componentes mais dispersos (**Fig. 6F**). Com relação ao carcinoma mamário tubular simples (grau I) observa-se células organizadas em estruturas tubulares tortuosas, com anastomoses, estratificação parietal e entremeadas por moderada quantidade de estroma fibroso com foco de hialinização do colágeno (**Fig. 6G e H**).

Já na neoplasia mamária apresentada pelo animal 5, o carcinoma mamário tubular simples (grau I) revela proliferação neoplásica multinodular em subcutâneo, pouco delimitada e de crescimento invasor. As células organizam-se em estruturas tubulares dilatadas, tortuosas, entremeadas por moderada quantidade de estroma fibroso com foco de desmoplasia (**Fig. 6I**). Por meio do tecido descelularizado é possível observar maior quantidade de MEC sem a presença dos componentes celulares (**Fig. 6J**).

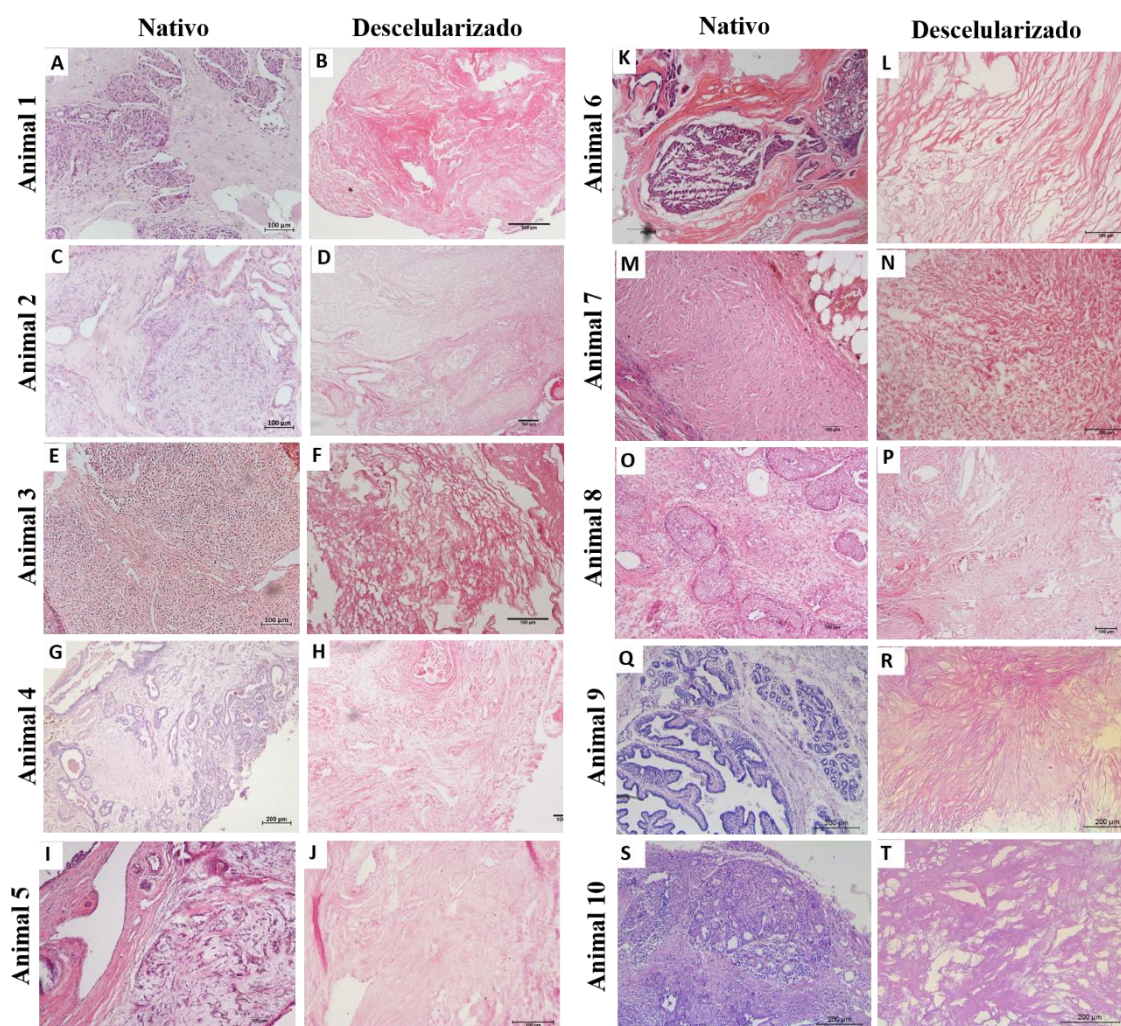
Quanto ao animal 6, não foi diagnosticado neoplasia, apenas uma Hiperplasia lobular regular o qual revelou o tecido mamário expandido com aumento moderado de ductos e ácinos por lóbulo, além de manutenção da arquitetura, que mostra os lóbulos agregados em pacotes, com lumens distintos e sem fibrose evidente (**Fig 6K**). No tecido descelularizado nota-se diferenças com relação aos outros animais, visto que as fibras presentes na matriz se apresentam de maneira mais dispersas, contínuas e não tão densas (**Fig. 6L**). Por outro lado, a **Fig. 6M** revela uma neoplasia fusocelular, na qual as células estão representadas em feixes multidirecionais, longos, com estroma colagenoso entremeando. A sua matriz, ao contrário do animal 6, se apresenta de forma mais unida, porém com fibras curtas e enroladas (**Fig. 6N**).

Da mesma forma que o animal 1, o comedocarcinoma mamário (grau II) apresentou como características uma proliferação multilobular, com presença de comedonecrose dentro dos lóbulos sólidos, e um estroma fibroso em grande quantidade e frouxo (**Fig. 6O**), podendo ser melhor observado no tecido descelularizado. Além disso, no estroma nota-se uma inflamação linfocítica moderada (**Fig. 6P**). Em relação ao carcinoma mamário tubulopapilar (grau I) observou-se uma proliferação neoplásica mais focal, onde as células se organizavam em túbulos estratificados, e com focos mostrando crescimento em projeções papilares. As regiões tubulares são entremeadas por um estroma fibroso moderado, e nas regiões papilares há um estroma fibrovascular

moderado de sustentação (**Fig. 6Q**). Pelo tecido descelularizado observa-se os componentes fibrilares organizados, e compondo todo o tecido (**Fig. 6R**).

O carcinoma mamário tubular simples (grau I) revelou presença de grande quantidade de estroma fibroso, o qual se encontra entremeado entre as células organizadas em estruturas tubulares tortuosas (**Fig. 6S**). E é possível observar fibras espessas e espaçadas aonde se encontravam os componentes celulares (**Fig. 6T**).

Figura 6. Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração H&E, escala de 100 µm.



3.4.2 Coloração de Tricômio de Gomori

Por meio desta coloração foram observadas as fibras colágenas coradas em azul nas neoplasias mamárias. As fibras de colágeno se encontravam circundando o aglomerado de células neoplásicas na neoplasia do animal 1, enquanto o tecido descelularizado continha somente as fibras de colágeno no tecido (**Fig. 7A e B**).

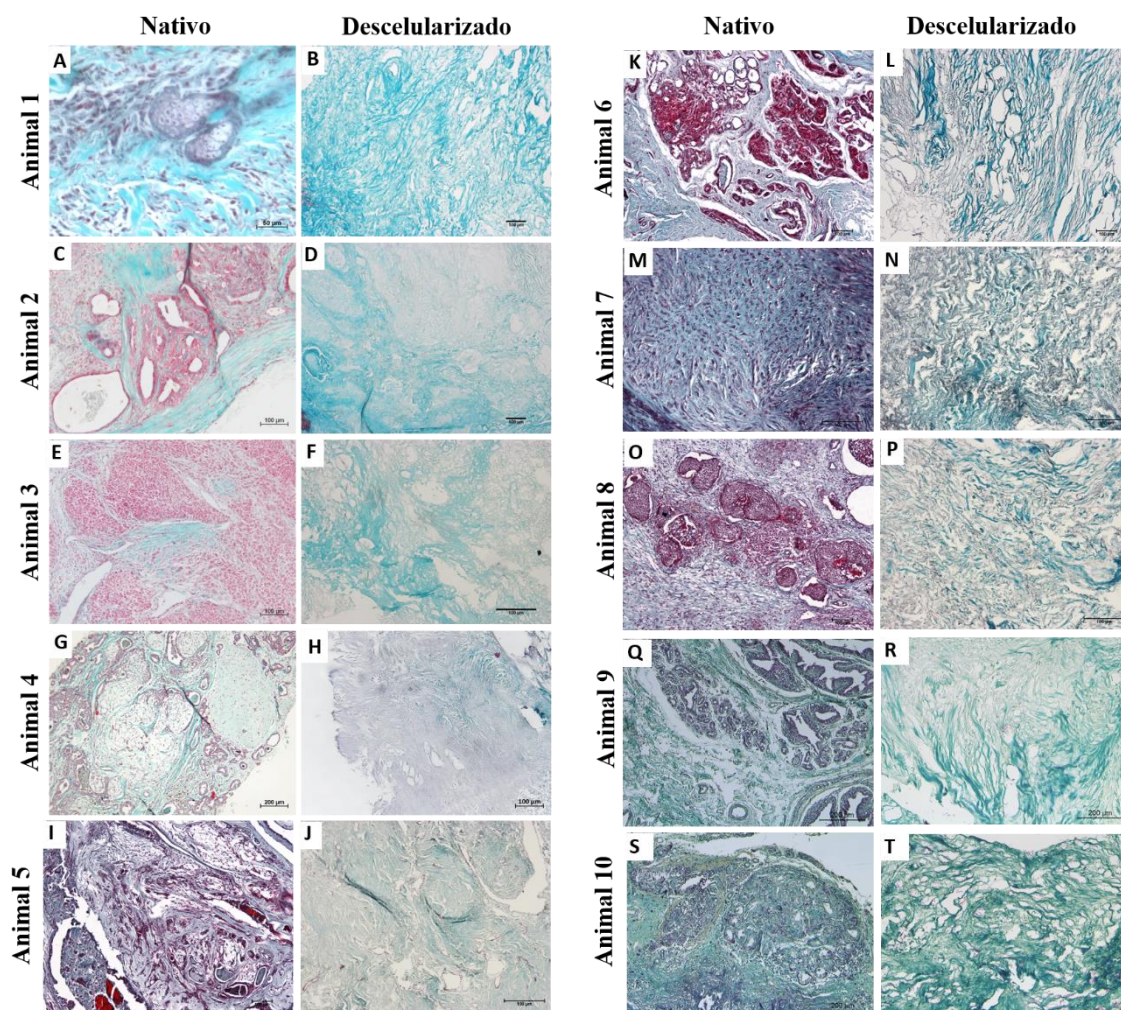
Entremeadas ao redor das células tubulares, há a presença de colágeno no estroma do *carcinoma mamário complexo (grau I)*, com um foco maior na região central (**Fig. 7C**), e esta presença se intensifica ao observarmos o tecido descelularizado (**Fig. 7D**).

O *carcinoma mamário sólido (grau III)* mostra uma quantidade moderada de fibras colágenas ao redor do tapete sólido de células presentes, e maior quantidade desta proteína quando retiramos os componentes celulares do tecido (**Fig. 7E e F**). Já no *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* a marcação em azul das fibras colágenas encontra-se ao redor das células tubulares tortuosas com uma maior quantidade agrupada no centro (**Fig. 7G e H**). A mesma classificação tumoral, também diagnosticada no animal 5, apresentou moderada quantidade de fibras colágenas entremeadas nas estruturas tubulares dilatadas e tortuosas, e maior foco nas regiões de desmoplasia (**Fig. 7I**), e ainda uma maior marcação está presente no tecido descelularizado (**Fig. 7J**).

A *Hiperplasia lobular regular* revelou moderada quantidade de colágeno, mais localizada ao redor dos ductos e lóbulos agregados em pacotes, os quais se encontram delimitados (**Fig. 7K**), e por meio da descelularização é possível observar diferença na estrutura da MEC em comparação aos tecidos neoplásicos (**Fig. 7L**). Além disso, um padrão diferente é observado na *Neoplasia fusiforme*, onde as fibras colágenas estão totalmente entremeadas nos feixes celulares multidirecionais e longos (**Fig. 7M e N**).

No *comedocarcinoma mamário (grau II)* há presença de fibras colágenas ao redor dos lóbulos sólidos marcadas em azul (**Fig. 7O**), e estas fibras são mais finas com características de um estroma frouxo (**Fig. 7P**). Na neoplasia do animal 9 visualizamos moderada quantidade de colágeno ao redor da região tubular, enquanto a região de projeção papilar é marcada por uma quantidade discreta de fibras, caracterizando um tecido de sustentação (**Fig. 7Q**). Já no tecido descelularizado notamos fibras de espessura moderada, no entanto as fibras mais finas preenchem grande parte do tecido (**Fig. 7R**). O *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* mostra grande quantidade de fibras colágenas circundando as estruturas tubulares (**Fig. 7S e T**).

Figura 7. Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Tricômio de Gomori, escala de 100 μm .



3.4.3 Coloração de Picrossírus

Nesta coloração, no tecido nativo do *comedocarcinoma mamário (grau II)* visualizamos as fibras colágenas de espessura mais fina, ao redor da neoplasia multilobular e da região central de necrose (**Fig. 8A**). Por outro lado, o tecido descelularizado mostra fibras de colágeno mais espessas e em maior quantidade (**Fig. 8B**). A neoplasia mamária do animal 2 revelou presença de colágenos em maior quantidade do que o tecido nativo do animal 1, e circundando as estruturas tubulares (**Fig. 8C**), e de forma mais evidente, no tecido descelularizado, estas fibras constituem grande parte do tecido (**Fig. 8D**).

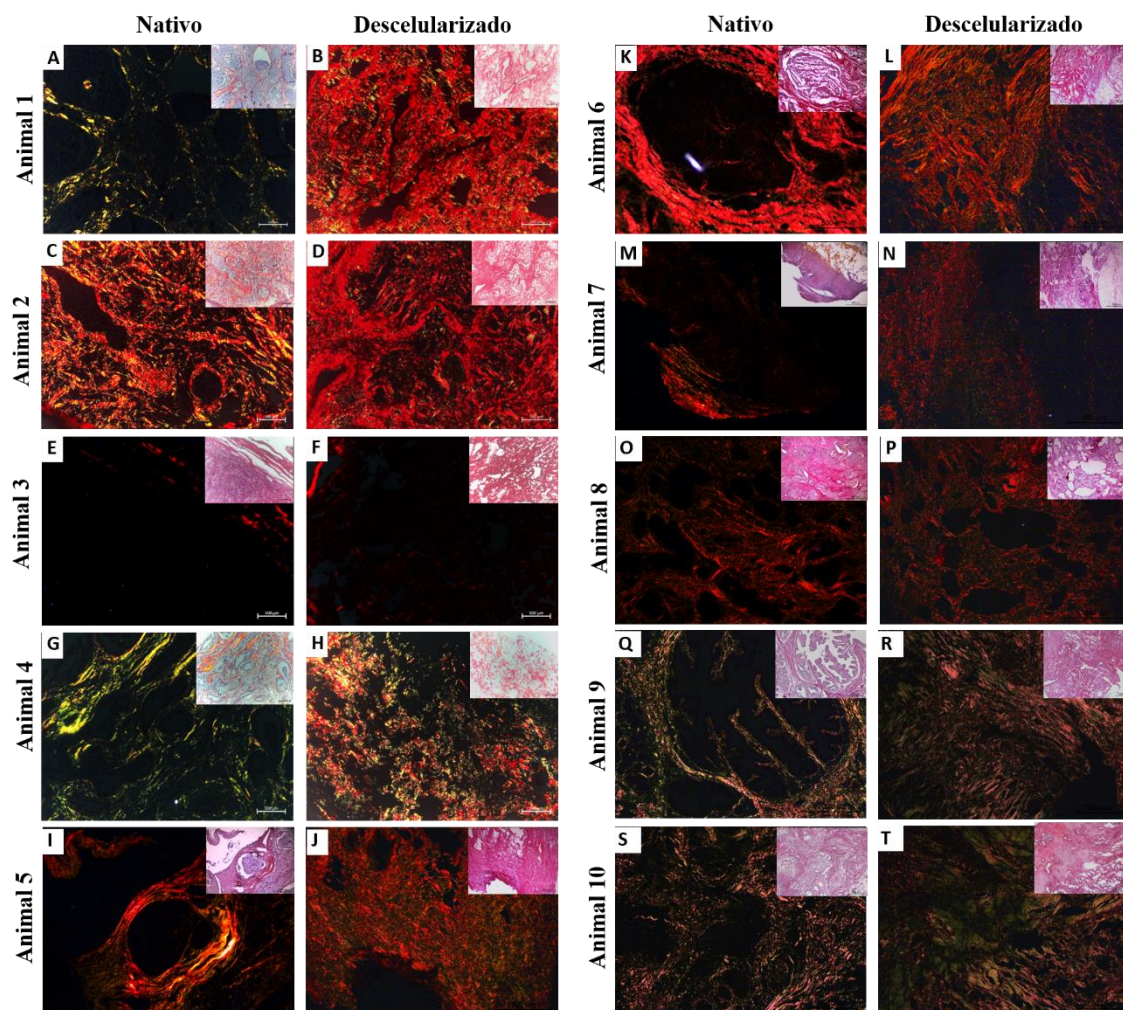
Ao contrário dos tipos histológicos anteriores, no *carcinoma mamário sólido (grau III)* quase não é possível visualizar a marcação de colágenos, apresentando discreta presença destas fibras, tanto no tecido nativo quanto no tecido descelularizado

(**Fig. 8E e F**). Com relação ao *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* é possível observar presença de fibras de pouca espessura, as quais se encontram entremeadas entre as células tubulares tortuosas (**Fig. 8G**), enquanto o tecido descelularizado mostra maior quantidade de fibras do que o nativo (**Fig. 8H**). O mesmo tipo neoplásico, observado no animal 5, revelou fibras colágenas de espessura moderada ao redor do foco de desmoplasia e menor quantidade de fibras circundando as estruturas tubulares dilatadas do tecido (**Fig. 8I e J**).

Na *Hiperplasia lobular regular* fibras colágenas foram visualizadas grande espessura envolvendo os ductos e lóbulos agregados (**Fig. 8K**), e no tecido descelularizado observa-se a presença de fibras de espessura moderada, porém em maior quantidade do que o tecido nativo (**Fig. 8L**). Com relação a *neoplasia fusiforme* há discreta quantidade de colágeno no tecido nativo, porém ocorre maior marcação destas fibras em parte do tecido descelularizado (**Fig. M e N**).

Observa-se moderada quantidade de fibras colágenas marcadas em vermelho no *comedocarcinoma mamário (grau II)* (**Fig. 8O**), assim como observamos no tecido descelularizado (**Fig. 8P**). No *carcinoma mamário tubulopapilar (grau I)* visualiza-se colágenos em quantidade moderada e de espessura fina, e é possível notar estas fibras nas projeções papilares (**Fig. 8Q e R**). Tratando-se do *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* há uma quantidade moderada de fibras colágenas no tecido, apresentando-se de espessura fina e algumas em formato circular, acompanhando as estruturas tubulares da neoplasia (**Fig. 8S e T**).

Figura 8. Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Picrosúris red, escala de 100 µm.

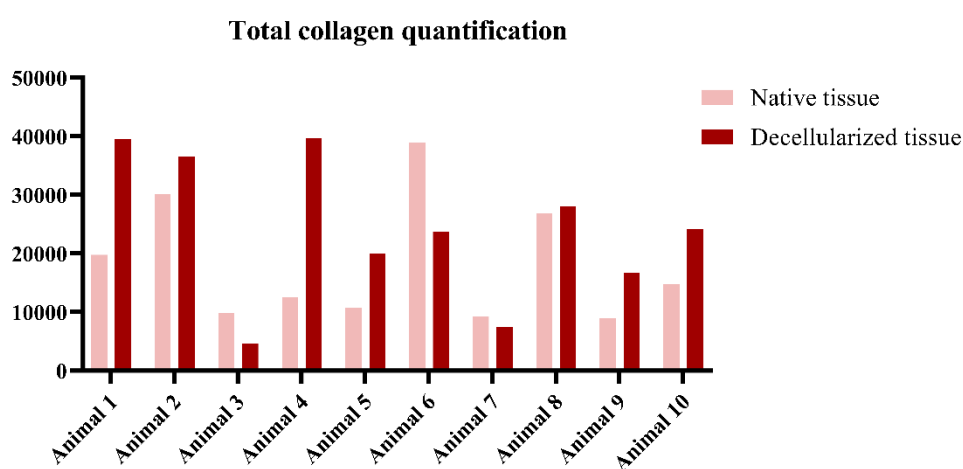


3.4.4 Quantificação de colágenos totais

A quantificação total de colágenos revelou diferenças entre o tecido nativo e descelularizado. Com exceção dos animais 3, 6 e 7, nos demais casos o tecido descelularizado apresentou maior quantidade do que em comparação ao tecido nativo. Levando em consideração o tecido nativo, dentre os tipos histológicos que apresentaram maior quantidade de fibras colágenas, em ordem decrescente encontram-se: hiperplasia lobular regular referente ao animal 6, carcinoma mamário complexo (grau I) do animal 2 e o comedocarcinoma mamário (grau II) diagnosticado nos animais 1 e 8. Enquanto que os tumores que apresentaram menor quantidade de colágeno foram o carcinoma mamário sólido (grau III), a neoplasia fusiforme e o carcinoma mamário tubulopapilar (grau I), sendo, respectivamente, referentes ao animal 3, 7 e 9 (**Gráfico 3**).

Contudo, como já mencionado, o tecido descclularizado apresentou resultados significativamente diferentes em relação ao tecido nativo, evidenciando maiores quantidades de colágeno na maioria das neoplasias analisadas. Os tumores que apresentaram maiores quantidades, em ordem decrescente, foram: comedocarcinoma mamário (grau II), carcinoma mamário complexo (grau I) e o carcinoma mamário tubular simples (grau I). Enquanto os tumores que mostraram menores quantidades de colágeno continuaram sendo o carcinoma sólido (grau III) e a neoplasia fusocelular.

Gráfico 3. Gráfico representando a quantificação de colágenos totais das neoplasias mamárias dos animais 1 a 10.



3.4.5 Coloração Alcian Blue

Tratando-se da coloração de Alcian Blue, identificamos a presença de GAGs presentes nas neoplasias e nos tecidos descclularizados. Observa-se intensa marcação de azul turquesa na neoplasia *comedocarcinoma mamário (grau II)*, preenchendo o tecido ao redor das células neoplásicas, não sendo observada tal intensidade no tecido descclularizado (**Fig. 9A e B**). Quanto ao *carcinoma mamário complexo (grau I)* moderada marcação é observada entre a proliferação neoplásica, ao redor das estruturas tubulares e próximo aos focos de hialinização de colágeno (**Fig. 9C e D**).

Por outro lado, *carcinoma mamário sólido (grau III)* apresentou baixa marcação de azul turquesa, tanto no tecido nativo quanto no tecido descclularizado (**Fig. 9E e F**), indicando pouca presença de GAGs neste tipo histológico. O *Carcinoma mamário tubular simples (grau I)* revela pequena quantidade desta proteína entre as estruturas tubulares e tortuosas, enquanto uma maior marcação é conferida à região com focos de

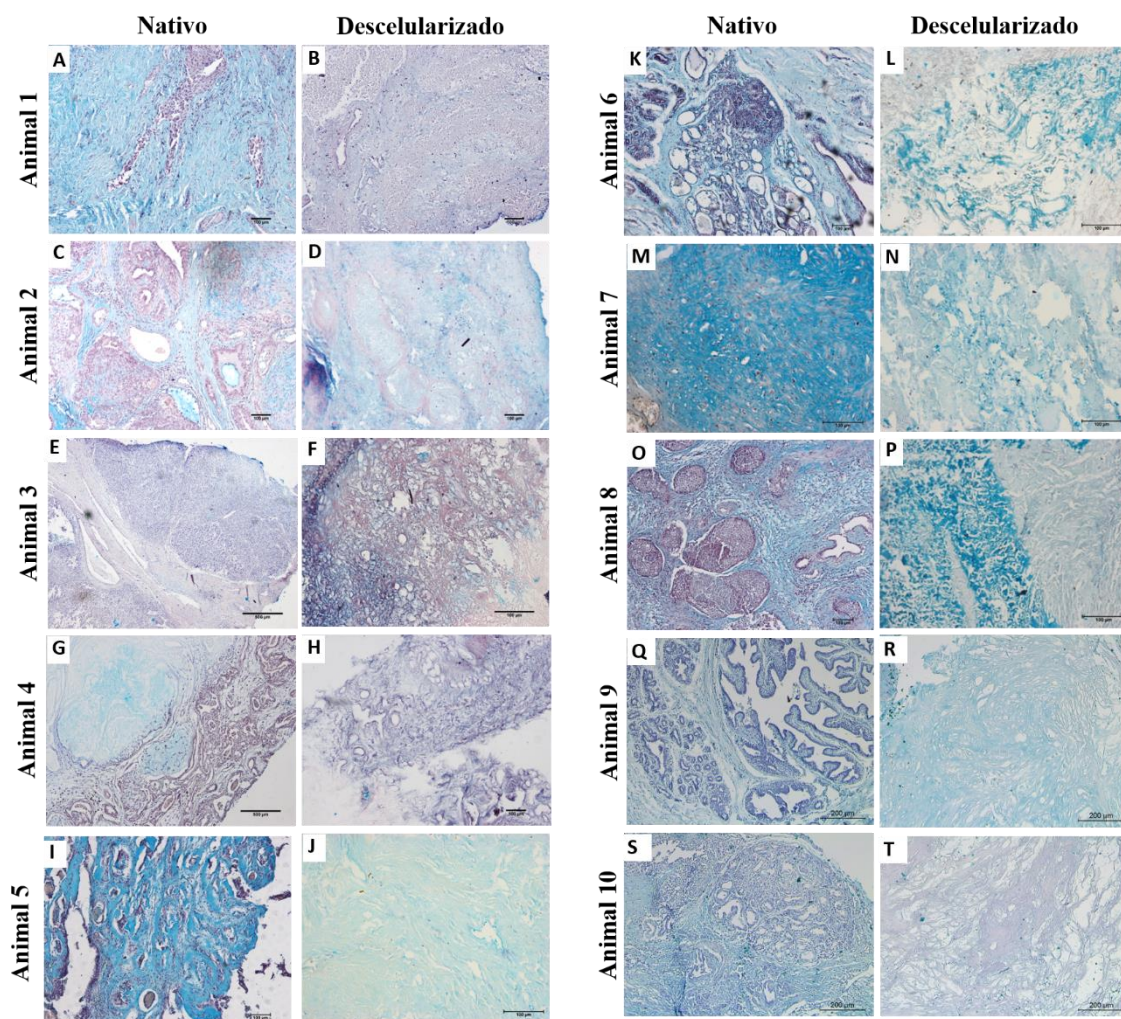
hialinização de colágeno (**Fig. 9G**); uma menor marcação é notada no tecido descelularizado (**Fig. 9H**).

Na mesma classificação histológica, foi possível observar uma intensa marcação desta coloração ao redor das estruturas tubulares dilatadas e da proliferação neoplásica multinodular, principalmente nos focos de desmoplasia (**Fig. 9I**), e uma marcação em todo o tecido, porém mais leve no tecido descelularizado (**Fig. 9J**). Em relação a *Hiperplasia lobular regular* houve marcação moderada de GAGs, visualizados ao redor dos ductos e ácidos, e lóbulos agregados (**Fig. 9K e L**).

A *neoplasia fusocelular* demonstrou intensa marcação de GAGs em sua matriz, onde estão totalmente entremeados ao redor dos feixes celulares multidirecionais e longos (**Fig. 9M**); uma marcação menos intensa foi observada no tecido descelularizado (**Fig. 9N**). No que se refere ao *comedocarcinoma mamário (grau II)* há uma quantidade significativa de marcação azul turquesa no estroma desta neoplasia, circundando a proliferação neoplásica multilobular (**Fig. 9O e P**).

Já no *carcinoma mamário tubulopapilar (grau I)* a marcação de GAGs se encontra no tecido ao redor das células tubulares e no interior das projeções papilares (**Fig. 9Q**), enquanto maior marcação deste componente é visualizada na MEC descelularizada (**Fig. 9R**). Por fim, o *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* constitui-se de uma marcação moderada de GAGs ao redor das células tubulares tortuosas (**Fig. 9S**), evidenciada em menor quantidade no tecido descelularizado (**Fig. 9T**).

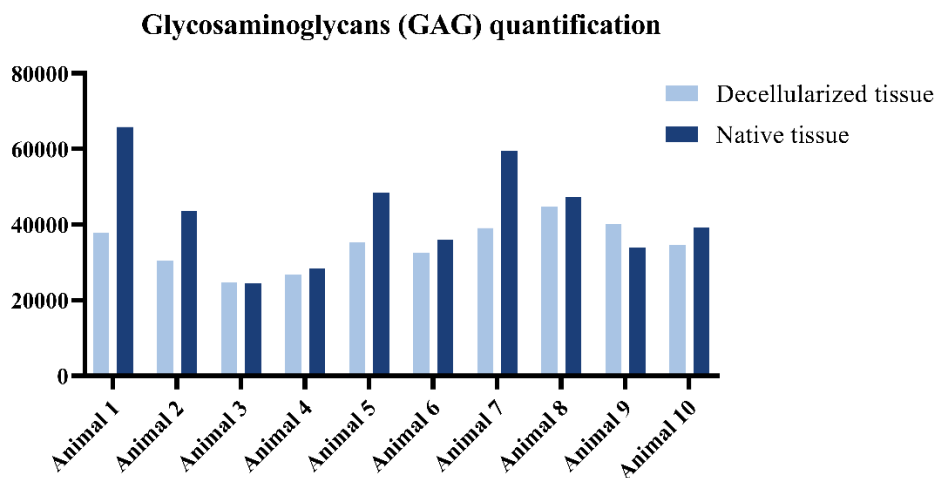
Figura 9. Análises histológicas referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado. Coloração Alcian Blue, escala de 100 μ m.



3.4.6 Quantificação de glicosaminoglicanos

Na quantificação de glicosaminoglicanos, a quantidade de GAGs, na maioria dos casos, foi similar entre o tecido nativo e o tecido descelularizado, indicando uma boa preservação desta proteína na amostra descelularizada. Comparando as diferentes classificações histológicas dos casos, os que apresentaram maior quantidade de GAGs no microambiente tumoral foram: o comedocarcinoma mamário (grau II), carcinoma mamário complexo (grau I), carcinoma mamário tubular simples (grau I) e a neoplasia fusocelular, diagnosticados, respectivamente, nos animais 1, 2, 5, 7 e 8. Enquanto as neoplasias que apresentaram menor quantidade desta proteína foram: carcinoma mamário sólido (grau III) e o carcinoma mamário tubular simples (grau I), representando, respectivamente, os animais 3 e 4 (**Gráfico 4**).

Gráfico 4. Gráfico representando a quantificação de glicosaminoglicanos das neoplasias mamárias dos animais 1 a 10.



3.4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

No *comedocarcinoma mamário (grau II)*, no tecido descelularizado, suas fibras, na maioria são mais finas e encontram-se dispersas no microambiente tumoral (**Fig. 10A e B**). Nota-se no *carcinoma mamário complexo (grau I)* uma proliferação neoplásica não delimitada e presença de grande quantidade de estroma fibroso no tecido (**Fig. 10C**), e o tecido descelularizado evidencia os componentes fibrilares mais unidos, com fibras mais espessas e alinhadas (**Fig. 10D**).

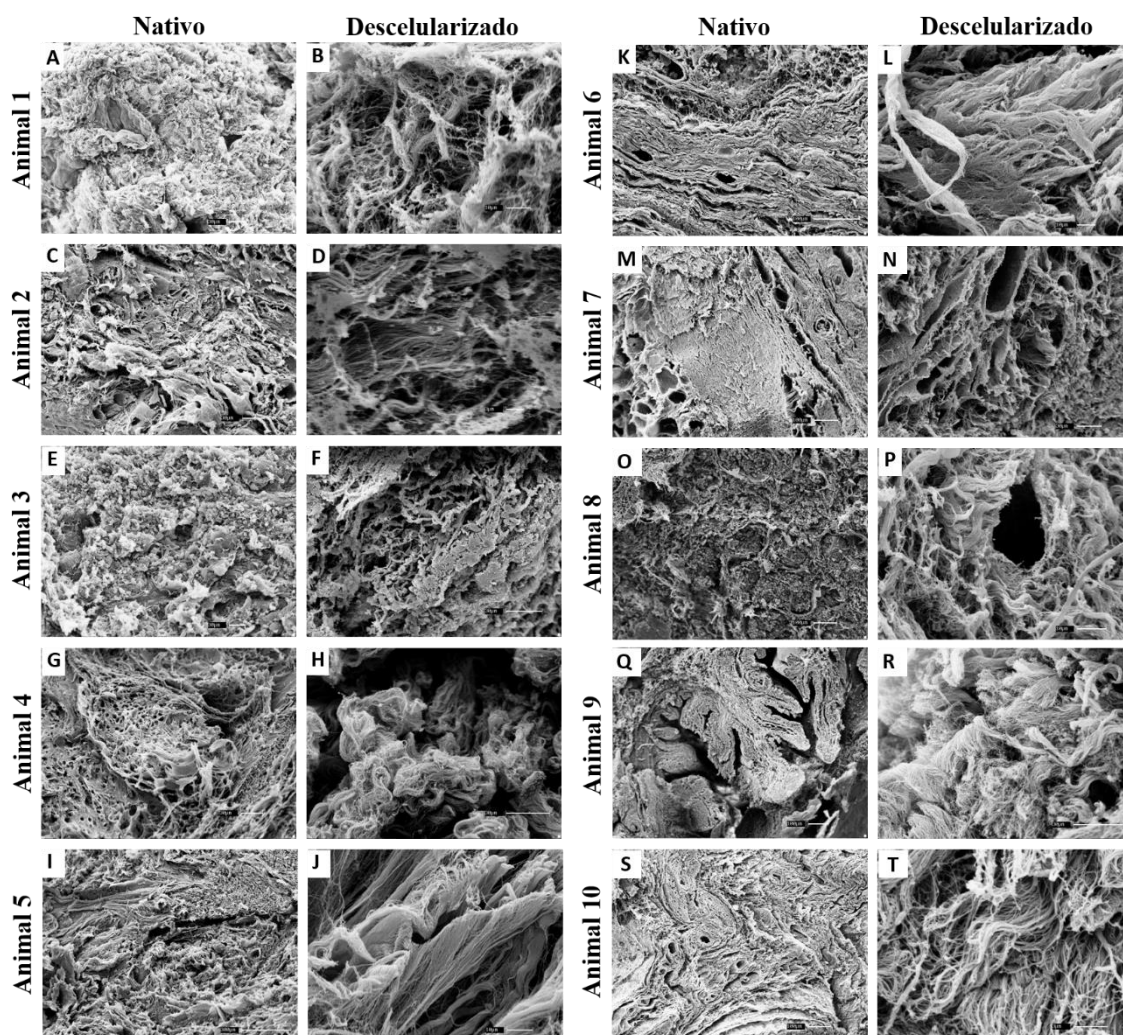
No *carcinoma mamário sólido (grau III)* é possível observar as células neoplásicas e os componentes fibrilares na MEC de maneira mais desorganizada (**Fig. 10E e F**). Com relação ao *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* visualiza-se as células em forma de estruturas tubulares, com presença de inflamação no tecido (**Fig. 10G**), e a mesma estrutura é evidenciada no tecido descelularizado, contendo fibras mais espessas e unidas (**Fig. 10H**).

A mesma classificação histológica também é marcada por estruturas tubulares e tortuosas, e há moderada quantidade de estroma fibroso (**Fig. 10I**). É interessante notar a estrutura e organização dos componentes fibrilares na matriz, os quais mostram fibras muito espessas, e organizadas de maneira bastante alinhada e unidas (**Fig. 10J**). Já a *Hiperplasia lobular regular* possui características diferentes, com o tecido mamário expandido e sem fibrose evidente (**Fig. 10K**), e o tecido descelularizado mostra um estroma unido e preenchendo bem o tecido (**Fig. 10L**).

A *neoplasia fusocelular* se apresenta com células em feixes multidirecionais e longos, e o tecido descelularizado evidencia o mesmo formato, com os espaços onde se localizavam as células em formato de feixe (**Fig. 10M e N**). A MEV revelou uma proliferação neoplásica em forma multilobular, com lóbulos sólidos no *comedocarcinoma mamário (grau II)* (**Fig. 10O**). Enquanto que a descelularização mostra os componentes fibrilares de espessura moderada, bastante unidos ao redor de uma abertura, a qual provavelmente se encontrava um vaso sanguíneo (**Fig. 10P**).

Na neoplasia do animal 9 foram observadas as projeções papilares, já reveladas anteriormente nas análises histológicas realizadas, a qual são características do *carcinoma mamário tubulopapilar (grau I)* (**Fig. 10Q**). Quando visualizado somente as fibras no tecido descelularizado, nota-se fibras de espessura moderada, unidas e alinhadas (**Fig. 10R**). No que se refere ao *carcinoma mamário tubular simples (grau I)* células se encontram organizadas em estruturas tubulares tortuosas no tecido entremeadas pela MEC (**Fig. 10S**). E no tecido com a ausência de componentes celulares é possível visualizar fibras mais finas e alinhadas (**Fig. 10T**).

Figura 10. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) referentes às classificações histológicas dos 10 animais acometidos com neoplasia mamária, comparando o tecido nativo com o tecido descelularizado.



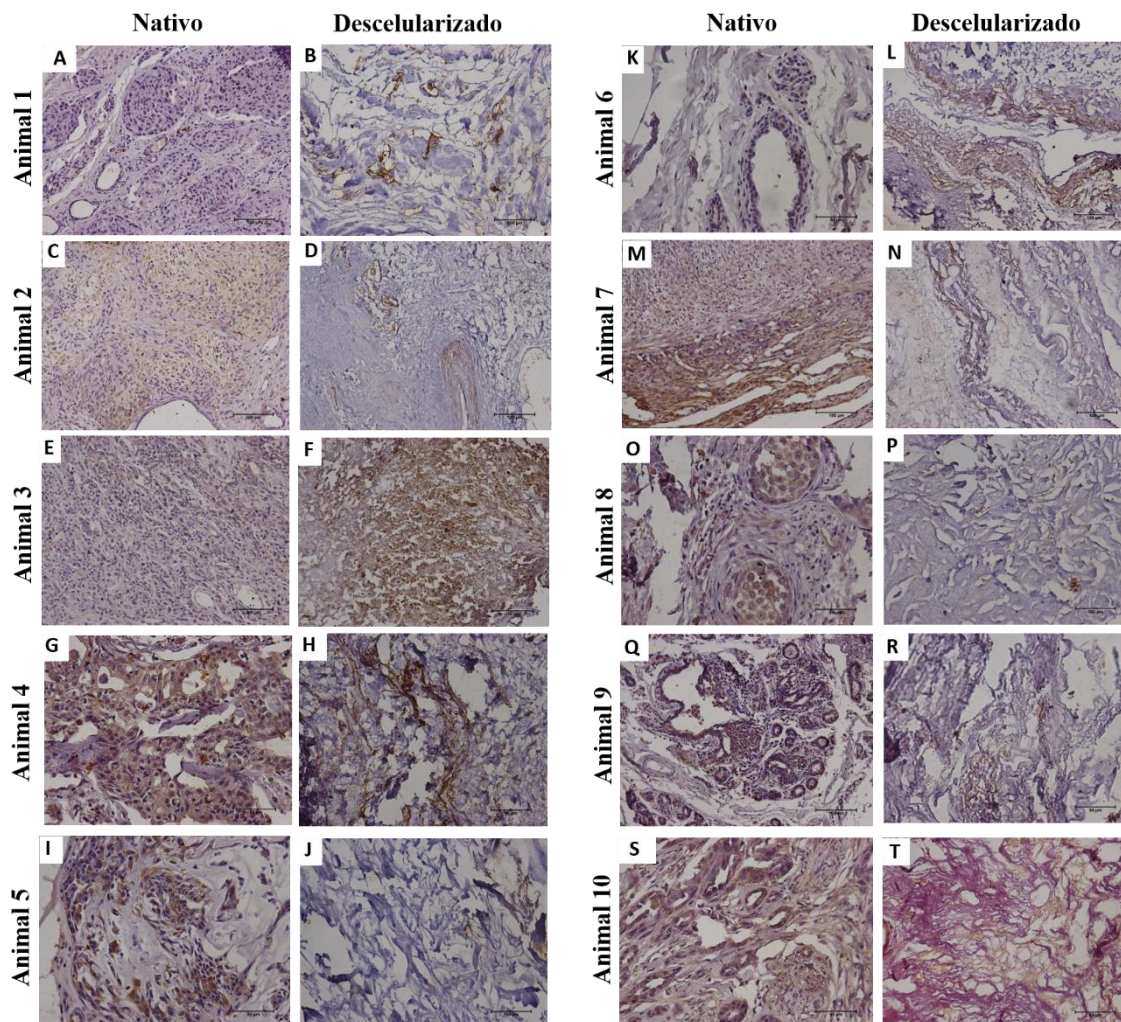
3.4.8 Imuno-histoquímica

Referindo-se ao tecido nativo, os resultados revelaram maior expressão de colágeno tipo III nas neoplasias mamárias dos animais 2, 4 e 7, os quais correspondem, respectivamente, ao carcinoma mamário complexo (grau I), carcinoma mamário tubular simples (grau I) e a neoplasia fusocelular. Já os tumores dos animais 1 e 3, sendo eles o comedocarcinoma mamário (grau II) e o carcinoma sólido (grau III) apresentaram mínima marcação desta proteína no tecido.

Ao visualizar somente a MEC no tecido descelularizado nota-se maior expressão de colágeno tipo III na neoplasia do animal 3, ao contrário do que foi observado com a presença de células no tecido nativo. Da mesma forma, observou-se maior marcação de

colágeno no tecido descelularizado na hiperplasia lobular referente ao animal 6, em que o tecido nativo apresentou baixa expressão de colágeno III (**Fig. 11**).

Figura 11. Imuno-histoquímica com expressão de colágeno tipo III em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado.

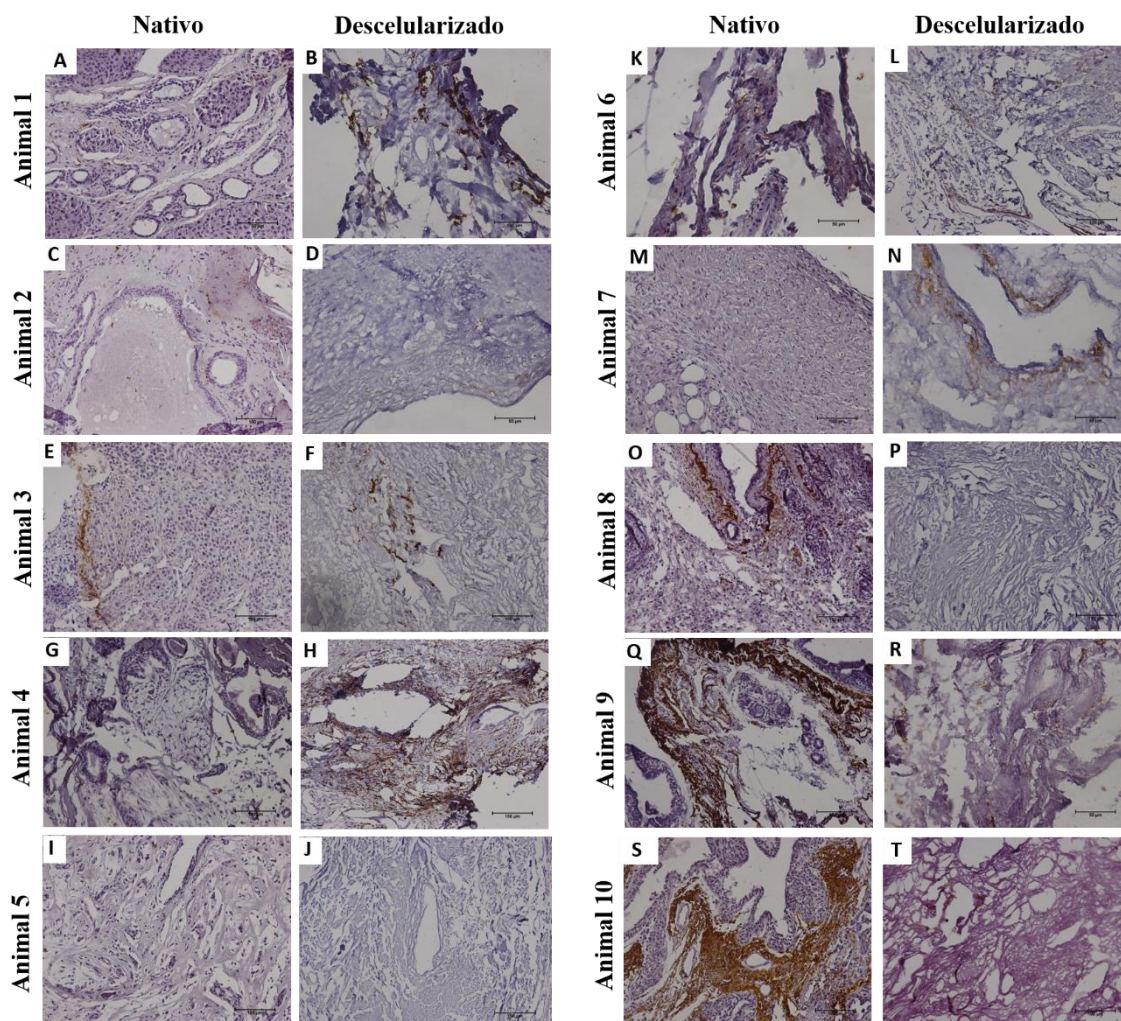


Na marcação com elastina, as imagens referentes ao tecido nativo mostraram uma expressão significativamente maior nos tumores mamários dos cães 9 e 10, representando o carcinoma mamário tubulopapilar (grau I) e o carcinoma mamário tubular simples (grau I), respectivamente. Enquanto as neoplasias dos animais 3 e 8 evidenciaram apenas uma pequena expressão desta proteína. Os demais tumores apresentaram pouca ou nenhuma marcação de elastina no seu tecido.

Levando em consideração o tecido descelularizado, a marcação de elastina foi mais evidente no animal 4, o qual corresponde ao carcinoma mamário tubular simples

(grau I), sendo ainda maior do que a marcação desta proteína no tecido nativo. Além disso, notou-se uma expressão discreta nos tumores dos animais 1, 3 e 7. Já no tecido descelularizado das demais neoplasias não houve praticamente nenhuma marcação de elastina (**Fig. 12**)

Figura 12. Imuno-histoquímica com expressão de elastina em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado.

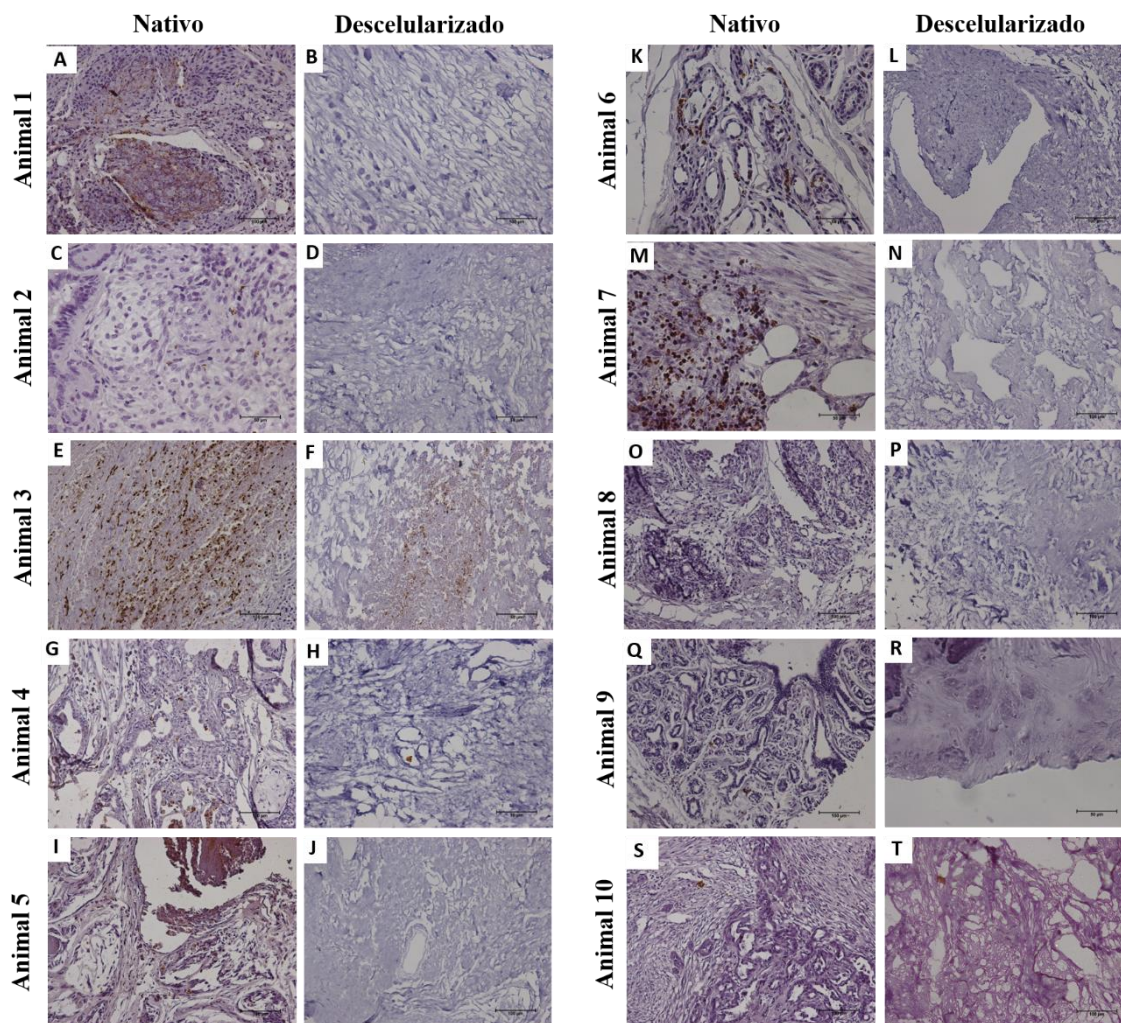


Quanto a expressão da MMP-9, é possível observar que esta enzima está presente em sua grande maioria no tecido nativo. No tecido descelularizado praticamente não foi observado marcação de MMP-9, com exceção do animal 3, visto que o processo de descelularização realizado tende a degradar as enzimas presentes no tecido.

Na neoplasia diagnosticada neste paciente, o carcinoma sólido, nota-se maior expressão desta enzima quando em comparação aos demais tumores. No entanto, é visualizada marcação moderada de MMP-9 no comedocarcinoma mamário (grau II) do

animal 1, carcinoma mamário tubular simples (grau I) do animal 5, na hiperplasia lobular do animal 6 e na neoplasia fusiforme do animal 7. Já nas demais neoplasias há uma discreta ou nenhuma marcação desta enzima no tecido (Fig. 13).

Figura 13. Imuno-histoquímica com expressão de MMP-9 em neoplasias mamárias caninas evidenciando o tecido nativo e descelularizado.



4. DISCUSSÃO

Assim como em humanos, o câncer de mama acomete com frequência a espécie canina, tendo uma grande relevância para esta espécie, considerando as taxas de incidência, e a ocorrência de recidivas e resistência à tratamentos. Diversos estudos em humanos já abordam características da MEC em tumores de mama, entretanto estes estudos ainda são escassos na medicina veterinária, sendo o estudo em questão um dos poucos que descrevem a estrutura da MEC em neoplasias mamárias caninas.

Há um grande interesse por parte da medicina em compreender as diferenças entre uma matriz normal e uma matriz acometida por neoplasias, visto que uma MEC reativa é capaz de fornecer sinais oncogênicos que facilitam a tumorigênese (PICKUP; MOUW; WEAVER, 2014; TSEGAYE et al., 2021; WINKLER et al., 2020). Dessa forma, este estudou visou identificar características da MEC de uma glândula mamária sadia, e comparar com a matriz acometida por tumores mamários caninos, levando em consideração que a MEC favorece a migração, fixação e sobrevivência de células tumorais. Além de atuar como uma barreira para células imunes e para eficácia de medicamentos; tornando-se relevante o seu estudo, o qual pode fornecer pistas promissoras para o direcionamento de estratégias terapêuticas.

O processo de descelularização adotado neste estudo vem sido descrito como um método eficaz para criação *scaffolds* e modelos 3D com base na MEC de diversos tecidos, inclusive para mimetizar o microambiente de doenças como o câncer de mama (GRATZER, 2019; JIN et al., 2019; LV et al., 2021; MAYORCA-GUILIANI et al., 2019). Tendo isso em vista, este estudo realizou a descelularização da glândula mamária sadia e de neoplasias mamárias caninas a fim de avaliar se este método também é eficiente para o estudo aprofundado da estrutura da MEC, retirando as células presentes no tecido e focando somente nos componentes da matriz.

Referente às análises dos tumores de mama, observamos que 9 dos 10 casos analisados eram neoplasias malignas, e dentre elas o tipo histológico mais prevalente foi o carcinoma mamário, corroborando com o que está descrito em literatura (FILHO et al., 2010; NUNES et al., 2018). Esta neoplasia costuma apresentar um comportamento de crescimento invasivo, com rápida evolução e capacidade de metástase, além de dificultar o estabelecimento de um prognóstico preciso, visto que caracterizam-se por comportamento biológicos muito diferentes (GUNDIM et al., 2016; NARDI; FERREIRA; ASSUNÇÃO, 2016).

Dentre os subtipos existentes de carcinoma mamário nota-se que o carcinoma sólido e o comedocarcinoma apresentaram, respectivamente, grau histológico II e III. Já se tem descrito que a graduação histológica está associada a tumores mais agressivos, e quanto maior for o grau pior será o prognóstico do paciente (CANADAS et al., 2018; KARAYANNOPOULOU et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2014). Karayannopoulou et al. (2005) indicaram que carcinomas mamários caninos de grau III tem risco de óbito 21

vezes maior do que carcinomas classificados como grau I e II. Ademais, verificou-se que o carcinoma sólido apresentou uma taxa de 65% de ocorrência de metástase a distância, ao passo que o comedocarcinoma apresentou 82% (RASOTTO et al., 2017).

Como já muito discutido anteriormente, pesquisas apontam a influência da castração na tumorigênese mamária canina, a qual pode evitar o desenvolvimento destas neoplasias devido a retirada do estímulo hormonal (ALONSO-DIEZ et al., 2019; SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969; SMITH, 2014; WARNES, 2018). Neste estudo, observou-se que os carcinomas de maiores graus histológicos eram referentes a fêmeas intactas, ou seja, não castradas. O que diverge dos resultados apresentados por Gedon, Wehend e Kessler (2022) em que fêmeas castradas foram associadas a subtipos de tumores mais agressivos.

Outro fator de risco já mencionado para tumores de mama é a obesidade. Corroborando ao relatado por Lim et al. (2015), os quais identificaram uma correlação entre cadelas classificadas com sobrepeso ou obesas e o diagnóstico de tumores de maiores graus histológicos, neste estudo o único paciente com uma neoplasia de grau histológico III apresentava obesidade.

Quanto a localização do tumor na cadeia mamária, os dados se assemelham ao descrito por Cassali et al. (2020), em que 75% dos casos de neoplasia mamária o tumor estava localizado nas mamas abdominal caudal (M4) e inguinal (M5), e de acordo com o que foi relatado neste estudo somente em 2 casos os tumores não estavam localizados nestas glândulas. Pode-se associar o maior acometimento destas glândulas a maior quantidade de parênquima presente nestas regiões, o que contribui para o desenvolvimento do câncer de mama (CHANDRA; CLINE; ADLER, 2010).

Ao analisar a matriz extracelular das neoplasias mamárias identificadas, o presente estudo revelou por meio da quantificação de colágeno que tanto no tecido nativo como no tecido descelularizado, o carcinoma sólido (grau III) foi o tipo histológico que apresentou menor quantidade de fibras colágenas em sua matriz, seguido da neoplasia fusiforme e do carcinoma tubulopapilar (grau I) referente ao animal 9. Assim como descrito no estudo de Garcia et al. (2021) dentro das regiões tumorais pode-se notar uma diminuição de colágeno, e tumores com menor quantidade destas fibras foram associados com um pior prognóstico.

Apesar de classificado como grau I, o carcinoma tubulopapilar diagnosticado neste estudo apresentou baixas quantidades de fibras colágenas em sua MEC. Descrito morfológicamente como túbulos infiltrantes com projeções papilares endoluminais e micropapilares, estrutura que foi evidenciada pela MEV, estudos relatam a agressividade desta neoplasia (DARVISHIAN et al., 2014; GUERRIERI; HUDACKO, 2020). Rasotto et al. (2017) indicaram que cães diagnosticados com este tipo histológico apresentaram risco de óbito 10 vezes maior do que outros tumores de mama. Sugerindo dessa forma, o colágeno como um possível indicador de agressividade tumoral.

Verificou-se uma maior expressão de colágeno tipo III na análise imuno-histoquímica em neoplasias que apresentaram grau histológico I, tais como o carcinoma mamário complexo e os carcinomas mamários tubulares. No câncer de mama em humanos, pacientes que apresentaram alta expressão de colágeno III foram associados a uma maior taxa de sobrevida (BECK et al., 2008).

Da mesma forma, um estudo anterior realizado em neoplasias mamárias caninas identificou que o colágeno tipo III apresentava maior expressão em tumores com menores graus histológicos, e conforme o grau aumentava, sua expressão era diminuída gradativamente (ACEVEDO et al., 2021). Tais dados são semelhantes aos encontrados neste estudo, em que o carcinoma sólido (grau III) demonstrou apenas uma discreta marcação de colágeno tipo III, bem como o comedocarcinoma mamário (grau II) diagnosticado no animal 1.

Pode-se relacionar a diminuição de colágeno em tumores com a degradação da MEC durante a progressão do câncer, a qual é substituída por uma MEC com maior rigidez e composição alterada, criando um microambiente de suporte ao tumor. Dessa forma, os níveis reduzidos de colágeno podem promover a sobrevivência, proliferação e influenciar em processos chaves para ocorrência de metástase (BRISSON et al., 2015; JÜRGENSEN et al., 2020; SCHEDIN; KEELY, 2011; THORSETH et al., 2022).

Em contrapartida, de forma interessante, a glândula mamária sadia bem como a hiperplasia lobular regular, a qual ainda não é considerada um câncer de mama, revelaram maiores quantidades de fibras colágenas na quantificação de colágenos, quando em comparação aos demais tumores mamários. Estes achados corroboram com outras pesquisas e suportam os dados que ocorre a diminuição de fibras colágenas no

microambiente tumoral (CECHOWSKA-PASKO; PAŁKA; WOJTUKIEWICZ, 2006; CHIMAL-RAMÍREZ et al., 2013; MORGAN; HILL, 2005).

A hiperplasia lobular apresentou quantidades similares de colágenos em relação a glândula mamária sadia, no entanto o tecido hiperplásico mostrou discretamente menor presença destas fibras. Mesmo não se enquadrando na classificação de tumores de mama, a hiperplasia da glândula mamária apresentar maiores riscos para o desenvolvimento de uma neoplasia (DEGNIM et al., 2018; MA et al., 2019; MURRAY et al., 2007; SANTOS et al., 2020).

Todavia, quando adotamos como parâmetro o tecido neoplásico descelularizado, observamos na quantificação de fibras colágenas que algumas neoplasias apresentaram maior quantidade de colágenos quando em comparação ao tecido nativo, como por exemplo o comedocarcinoma mamário (grau II), carcinoma mamário complexo (grau I) e o carcinoma mamário tubular simples (grau I). O mesmo é observado na imunohistoquímica na marcação de colágeno III no carcinoma sólido.

Pode-se hipotetizar que os componentes celulares sobrepõem algumas proteínas da matriz, e quando retiramos estes componentes, restando apenas a estrutura da MEC, a quantidade de algumas proteínas se sobressai e se apresentam em maior quantidade. Por outro lado, podemos relacionar estes dados com a coleta de diferentes regiões do tumor para o tecido nativo e o tecido descelularizado. No entanto, são necessários novos estudos para o esclarecimento destes dados.

Ainda com relação as fibras de colágeno, a técnica de descelularização permitiu observar na MEV a estrutura e organização dos componentes fibrilares do tecido, em que a glândula mamária sadia demonstrou fibras mais finas e de forma reticulares, enquanto os tecidos neoplásicos revelaram fibras mais espessas e unidas. Estudos realizados com câncer de mama em humanos já descreveram fibras colágenas mais retas e alinhadas na região intratumoral, as quais se encontravam paralelas umas às outras, o que sugere maior facilidade durante o processo de migração celular (BRABRAND et al., 2015).

As fibras mais alinhadas podem servir como suporte para a fixação e migração de células, acelerando o processo de invasão, e conseqüentemente a ocorrência de metástase. Tem sido relatado que as células epiteliais malignas iniciam a migração

quando entram em contato direto com as fibras de colágeno (NATAL et al., 2019; PROVENZANO et al., 2006; WEAVER et al., 1996).

Em cães, Garcia et al. (2021) verificaram que a glândula mamária sadia apresentava fibras colágenas dispostas em diferentes direções do tecido mamário, enquanto que nas neoplasias, incluindo casos benignos, os colágenos começavam a se organizar, da mesma forma como observado neste estudo. Contudo, os autores observaram fibras mais orientadas no carcinoma sólido, enquanto que no presente estudo verificou-se maior orientação dos componentes fibrilares no carcinoma mamário tubular simples (grau I) apresentado pelo animal 5 e 10.

Outro componente da MEC que possui um papel importante no desenvolvimento e na progressão do câncer é o glicosaminoglicano (GAG), visto que sua interação com proteínas adesivas, citocinas e fatores de crescimento influencia na regulação do crescimento, invasão e angiogênese do câncer (AFRATIS et al., 2012; KÖWITSCH; CHHALOTRE; GROTH, 2017). Estudos da medicina humana já descreveram o aumento de ácido hialurônico (AH), considerado um tipo de GAG, em diferentes tipos de carcinoma mamários, principalmente em tumores metastáticos (GÖTTE; YIP, 2006; UDABAGE et al., 2005).

Por meio de uma meta-análise, Wu et al. (2020) correlacionaram o aumento de AH no estroma de tumores de mama com um pior prognóstico destes pacientes. Além disso, evidências apontam que a síntese de AH pode fornecer um microambiente de suporte ao tumor. No presente estudo observou-se que apenas dois tipos histológicos apresentaram aumento de GAGs em comparação com a glândula mamária sadia, sendo eles o comedocarcinoma mamário (grau II) e a neoplasia fusocelular.

Como já descrito na literatura o comedocarcinoma possui maiores riscos de ocasionar o óbito de pacientes em decorrência da neoplasia, tendo em vista a alta taxa de metástase (CANADAS et al., 2018; RASOTTO et al., 2017), o que pode ser relacionado com maiores quantidades de GAGs. No entanto, as neoplasias fusocelulares, apesar de abrangerem diversos tipos histológicos, apresentam baixo potencial metastático e altas taxas de sobrevivência (ALONSO-DIEZ et al., 2019). Dessa forma, é incerta a correlação deste componente da MEC com a malignidade de neoplasias mamárias em cães, necessitando-se de novas análises da presença de GAGs em tumores de mama caninos.

Além do GAG, avaliou-se a presença de elastina na MEC destes tumores, levando em consideração que a elastina e seus produtos de degradação podem atuar de diferentes formas no processo oncológico. Foi vista maior expressão desta proteína no carcinoma mamário tubulopapilar (grau I) e no carcinoma tubular simples (grau I), correspondendo aos animais 9 e 10, respectivamente. Descreveu-se em humanos que o estroma de tecidos neoplásicos pode apresentar agregados densos de fibras elástica, denominados de elastose, a qual ocorre em 90% dos carcinomas mamários, e ainda sendo um possível indicador precoce de invasão tumoral (CHEN et al., 2021; ROLLAND; JACQUEMIER; MARTIN, 1980).

Apesar disso, as demais neoplasias mamárias, incluindo aquelas de grau mais elevado, apresentaram pouca ou nenhuma expressão de elastina em sua matriz. Isto pode ser explicado pela remodelação que ocorre na MEC durante a progressão do tumor, visto que no decorrer deste processo a elastina é enzimaticamente degradada, podendo gerar fragmentos bioativos que irão modular ainda mais o crescimento e a disseminação tumoral (WANG; SONG; RESNICK, 2020).

A degradação realizada pelas enzimas está relacionada a ação das MMPs, as quais degradam proteínas da matriz e estão associadas a diversos aspectos da progressão do câncer de mama, tais como proliferação, invasão, metástase e angiogênese (BENSON et al., 2013). Foi evidenciado neste estudo uma expressão positiva maior de MMP-9 no comedocarcinoma (grau II), carcinoma sólido (grau III) e na neoplasia fusocelular. De maneira interessante, nota-se nas duas primeiras neoplasias pouca ou nenhuma marcação de colágeno tipo III e elastina nos tecidos nativos.

Sabe-se que a MMP-9 tem como alvo em seu processo de degradação dentre outras proteínas, o colágeno III e elastina, sendo importante para a remodelação da MEC no desenvolvimento do câncer. Em pacientes humanos com câncer de mama foram observados altos níveis de MMP-9 tanto no tecido tumoral como em plasma e urina, e estes achados foram correlacionados com os graus histológicos e com a sobrevivência dos pacientes (JAVADIAN et al., 2019; WU et al., 2008). Nos tumores dos animais 9 e 10, em que não houve nenhuma marcação de MMP-9 observou-se alta expressão de elastina e expressão moderada de colágeno III.

5. CONCLUSÃO

A MEC se demonstrou uma rede estrutural complexa, em que seus diversos componentes se alteram de maneira significativa na presença de neoplasias mamárias. Revelou-se mudanças estruturais nas fibras colágenas nos tumores mamários quando comparados a glândula sadia, além de menores quantidades de colágeno no estroma intratumoral, o que pode ser correlacionado com maiores graus histológicos desta neoplasia em cães. Assim como ocorre no câncer de mama em humanos, foi possível notar a importância da MMP-9 para a degradação de colágeno e elastina em tumores mamários caninos, favorecendo o processo de invasão e progressão tumoral.

O método de descelularização se mostrou valioso para avaliação focada nos componentes da MEC e na sua remodelação na ocorrência do câncer, revelando maior presença de componentes com a retirada das células em determinados tumores, no entanto ainda são necessárias novas pesquisas utilizando este método, em um número maior de amostras. O presente estudo mostrou alterações importantes na estrutura e nos componentes da MEC que ocorrem em diferentes tipos histológicos de tumores mamários em cães, podendo fornecer subsídios importantes para a pesquisa e desenvolvimento de terapias adjuvantes focadas em constituintes da MEC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, H. D. et al. Characterization of Type I and III Collagen Fibers in the Stroma of Female Canine Mammary Tumors. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 78–84, 2021.
- AFRATIS, N. et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1177–1197, 1 abr. 2012.
- AHIRWAR, D. K. et al. Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation. **Oncogene**, v. 37, n. 32, p. 4428–4442, 3 ago. 2018.
- AKALU, A.; BROOKS, P. . Matrix, extracellular and interstitial. In: MEYERS, R. A. (Ed.). . **Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine**. 2nd. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2004.
- ALABI, B. R.; LARANGER, R.; SHAY, J. W. Decellularized mice colons as models to study the contribution of the extracellular matrix to cell behavior and colon cancer progression. **Acta Biomaterialia**, v. 100, p. 213–222, 1 dez. 2019.
- ALKASALIAS, T. et al. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 48, p. 17188–17193, 2 dez. 2014.
- ALONSO-DIEZ, Á. et al. Canine Spindle Cell Mammary Tumor: A Retrospective Study of 67 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 4, p. 526–535, 11 jul. 2019.
- AMINI, P. et al. Differential stromal reprogramming in benign and malignant naturally occurring canine mammary tumours identifies disease-modulating stromal components. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5506, 26 dez. 2020.
- ANDRADE, F. H. E. et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. **Diagnostic Pathology**, v. 5, n. 1, p. 45, 30 dez. 2010.
- ARAÚJO, M. R.; CASSALI, G. D. Anatomopatologia do Tumor Primário e Linfonodos. In: CASSALI, G. D. (Ed.). . **Patologia mamária canina: Do diagnóstico ao tratamento**. 1. ed. São Paulo: Medvet Ltda., 2017. p. 61–70.
- ARESU, L. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 33, 4 jul. 2011.
- AUVINEN, P. K. et al. Expression of hyaluronan in benign and malignant breast lesions. **International Journal of Cancer**, v. 74, n. 5, p. 477–481, 21 out. 1997.
- BABA, A.; CÂTOI, C. Chapter 11 MAMMARY GLAND TUMORS. **Comparative Oncology**. Bucharest, p. 15–16, 2007.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. **Biomaterials**, v. 28, n. 25, p. 3587–3593, 1 set. 2007.
- BARBIERI, F. et al. In vitro and in vivo antiproliferative activity of metformin on stem-like cells isolated from spontaneous canine mammary carcinomas: Translational implications for human tumors. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–17, 7 abr. 2015.
- BAUMAN, T. M. et al. Characterization of Fibrillar Collagens and Extracellular Matrix of Glandular Benign Prostatic Hyperplasia Nodules. 2014.

- BECK, A. H. et al. The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 6, p. 591–601, 14 jun. 2008.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. v. 436, p. 423–436, 1999.
- BENSON, C. S. et al. Expression of Matrix Metalloproteinases in Human Breast Cancer Tissues. **Disease Markers**, v. 34, n. 6, p. 395–405, 2013.
- BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nature Medicine**, v. 17, n. 3, p. 320–329, 7 mar. 2011.
- BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 9, n. 4, p. 241–250, dez. 2011.
- BRABRAND, A. et al. Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. A premise for tumour invasiveness? **APMIS**, v. 123, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2015.
- BRISSON, B. K. et al. Type III Collagen Directs Stromal Organization and Limits Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1471–1486, 1 maio 2015.
- BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. . Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital**, v. 19, p. 61–90, 1983.
- BROWNFIELD, D. G. et al. Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. **Current biology : CB**, v. 23, n. 8, p. 703–709, 22 abr. 2013.
- BRUNO, S. et al. Microvesicles Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Inhibit Tumor Growth. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 5, p. 758–771, 3 mar. 2013.
- CANADAS, A. et al. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 2, p. 208–219, 31 mar. 2018.
- CANAVESE, G. et al. Expression of proteoglycan versican in in situ breast lesions: Relations between stromal changes, histotype, and invasion. **Pathology - Research and Practice**, v. 207, n. 2, p. 97–103, 15 fev. 2011.
- CARVALHO, M. I. et al. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- CASE, A. et al. Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–19, 2017.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020.
- CECHOWSKA-PASKO, M.; PAŁKA, J.; WOJTUKIEWICZ, M. Z. Enhanced

prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, n. 4, p. 289–296, 23 maio 2006.

CHANDLER, C. et al. The double edge sword of fibrosis in cancer. **Translational Research**, v. 209, p. 55–67, 1 jul. 2019.

CHANDRA, S. A.; CLINE, J. M.; ADLER, R. R. Cyclic morphological changes in the beagle mammary gland. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 6, p. 969–983, 2010.

CHEN, R.-N. et al. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 25, n. 13, p. 2679–2686, 1 jun. 2004.

CHEN, Y. et al. Tumor-associated lymphocytes and macrophages are related to stromal elastosis and vascular invasion in breast cancer. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 7, n. 5, p. 517–527, 2 set. 2021.

CHIMAL-RAMÍREZ, G. K. et al. MMP1, MMP9, and COX2 Expressions in Promonocytes Are Induced by Breast Cancer Cells and Correlate with Collagen Degradation, Transformation-Like Morphological Changes in MCF-10A Acini, and Tumor Aggressiveness. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. **The Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 488–499, 1 jul. 2003.

CHOI, J. S. et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. **Biomaterials**, v. 31, n. 26, p. 6738–6745, 1 set. 2010.

CLAUSE, K. C.; BARKER, T. H. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 830–833, 2013.

CONKLIN, M. W. et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3, p. 1221–1232, 2011.

CORDES, N. et al. Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain ® in human tumour and normal cells in vitro. **International Journal of Radiation Biology**, v. 79, n. 9, p. 709–720, 3 set. 2003.

COX, R. F.; MORGAN, M. P. Microcalcifications in breast cancer: Lessons from physiological mineralization. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 437–450, 1 abr. 2013.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 1 abr. 2011.

CUNHA, S. et al. Adverse Effects of Chemotherapy in Dogs. **World s Veterinary Journal**, v. 7, n. 3, p. 74, 2017.

DAMASCENO, K. A. et al. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 20 out. 2012.

DAMASCENO, K. A. et al. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 1, p. 146–151, 1 abr. 2014.

- DAMASCENO, K. A. et al. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrixproducing tumours in the canine mammary gland. **Histology and Histopathology**, v. 31, n. 6, p. 675–688, 1 jun. 2016.
- DARVISHIAN, F. et al. Breast Carcinoma With Tubulopapillary Features. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 47–54, 4 fev. 2014.
- DAVIDSON, A. .; STABENFELDT, G. H. A glândula mamária. In: **Tratado de Fisiologia Veterinária - Cunningham**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 439–448.
- DE CAMPOS, C. B. et al. Adjuvant Thalidomide and Metronomic Chemotherapy for the Treatment of Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms. **In Vivo**, v. 32, n. 6, p. 1659–1666, 1 nov. 2018.
- 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, 1 ago. 2018.
- DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, n. 3, p. 256–268, 2003.
- DEGNIM, A. C. et al. Model for Predicting Breast Cancer Risk in Women With Atypical Hyperplasia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 18, p. 1840–1846, 20 jun. 2018.
- DO CARMO SILVA, H. et al. Epidemiology of canine mammary gland tumours in Espírito Santo, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, p. 1–9, 2019.
- DOS ANJOS, D. S. et al. Deregulation of VEGFR-2 and PDGFR Expression and Microvascular Density in a Triple-Negative Model of Canine Malignant Mammary Tumors with Lymph Node or Lung Metastasis. **Veterinary Sciences 2019, Vol. 6, Page 3**, v. 6, n. 1, p. 3, 9 jan. 2019.
- DOW, S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2935, 17 jan. 2020.
- DYCE, K. M.; SACK, W. .; WENSING, C. J. . **Tratado de Anatomia Veterinária**. Elsevier E ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- EGENVALL, A. et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 69, n. 1–2, p. 109–127, 10 jun. 2005.
- EMANUELLI, M. P. et al. Myoepithelial cells and extracellular matrix in the cytologic differentiation of canine mammary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 451–458, 23 set. 2020.
- ERDÉLYI, I. et al. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, n. 2, p. 139–149, 9 ago. 2005.
- ERLER, J. T. et al. Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. **Cancer Cell**, v. 15, n. 1, p. 35–44, 6 jan. 2009.

- ETTLIN, J. et al. Analysis of Gene Expression Signatures in Cancer-Associated Stroma from Canine Mammary Tumours Reveals Molecular Homology to Human Breast Carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1101, 20 maio 2017.
- FALZON, G.; PEARSON, S.; MURISON, R. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 23, p. 6641–6652, 7 dez. 2008.
- FARMER, P. et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Nature Medicine**, v. 15, n. 1, p. 68–74, 4 jan. 2009.
- 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, 1 dez. 2009.
- FERREIRA, E. et al. Marcadores prognósticos e preditivos no câncer de mama. In: CASSALI, G. D. (Ed.). . **Patologia mamária canina: Do diagnóstico ao tratamento**. 1. ed. São Paulo: Medvet Ltda., 2017. p. 141–149.
- FERREIRA, L. P.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F. Decellularized Extracellular Matrix for Bioengineering Physiometric 3D in Vitro Tumor Models. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1397–1414, 1 dez. 2020.
- FILHO, J. C. O. et al. Estudo retrospectivo de 1 . 647 tumores mamários em cães 1. v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.
- FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.
- GARCÍA-GARETA, E.; PÉREZ, M. Á.; GARCÍA-AZNAR, J. M. Decellularization of tumours: A new frontier in tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 13, p. 204173142210916, 25 jan. 2022.
- GARCIA, A. P. V. et al. Canine mammary cancer tumour behaviour and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021.
- GEDON, J.; WEHREND, A.; KESSLER, M. Ovariectomy reduces the risk of tumour development and influences the histologic continuum in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 20, n. 2, p. 476–483, 23 jun. 2022.
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.
- GÖTTE, M.; YIP, G. W. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. **Cancer Research**, v. 66, n. 21, p. 10233–10237, 1 nov. 2006.
- GRATZER, P. F. Decellularized extracellular matrix for Cancer Research. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**, v. 1–3, p. 86–96, 2019.
- GRAU-BOVÉ, X.; RUIZ-TRILLO, I.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F. Origin and evolution of lysyl oxidases. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10568, 29 set. 2015.

- GRAUSS, R. . et al. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 126, n. 6, p. 2003–2010, 1 dez. 2003.
- GRAY, M. et al. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. April, p. 1–17, 28 abr. 2020.
- GRAYTON, J. E.; MILLER, T.; WILSON-ROBLES, H. In vitro evaluation of Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINE) drugs KPT-185 and KPT-335 against canine mammary carcinoma and transitional cell carcinoma tumor initiating cells. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 4, p. 1455–1467, 1 dez. 2017.
- GUERRIERI, C.; HUDACKO, R. Tubulopapillary Carcinoma: An Aggressive Variant of Invasive Breast Carcinoma With a Micropapillary DCIS-Like Morphology. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 28, n. 5, p. 536–540, 10 ago. 2020.
- GUJAM, F. J. A. 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, 29 jul. 2014.
- GUNDIM, L. F. et al. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 4, p. 318, 1 out. 2016.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 20 mar. 2012.
- HAYASHI, M. et al. Evaluation of Tumor Stiffness by Elastography Is Predictive for Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19, n. 9, p. 3042–3049, 3 set. 2012.
- HENKE, E.; NANDIGAMA, R.; ERGÜN, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, n. January, p. 1–24, 31 jan. 2020.
- HOSHIBA, T. Cultured cell-derived decellularized matrices: a review towards the next decade. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 23, p. 4322–4331, 14 jun. 2017.
- HOSHIBA, T. Decellularized Extracellular Matrix for Cancer Research. **Materials**, v. 12, n. 8, p. 1311, 22 abr. 2019.
- HOSHIBA, T.; TANAKA, M. Decellularized matrices as in vitro models of extracellular matrix in tumor tissues at different malignant levels: Mechanism of 5-fluorouracil resistance in colorectal tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 11, p. 2749–2757, 2016.
- ILLERA, J. C. et al. Steroids and receptors in canine mammary cancer. **Steroids**, v. 71, n. 7, p. 541–548, 1 jul. 2006.
- IM, K. S. et al. CD44+/CD24– Cancer Stem Cells Are Associated With Higher Grade of Canine Mammary Carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1041–1044, 1 nov. 2015.
- INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer.

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

IOZZO, R. V.; MURDOCH, A. D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. **FASEB J**, v. 10, n. 5, p. 598–614, 1996.

JAVADIAN, M. et al. The role of microRNAs regulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer development, progression, and metastasis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5399–5412, 22 maio 2019.

JENA, M. K.; JANJANAM, J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: a brief update. **F1000Research**, v. 7, p. 274, 2018.

JIN, Q. et al. Decellularized breast matrix as bioactive microenvironment for in vitro three-dimensional cancer culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 3425–3435, 2019.

JUNQUEIRA, L. .; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Editora Gu ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

JÜRGENSEN, H. J. et al. Cellular uptake of collagens and implications for immune cell regulation in disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 16, p. 3161–3176, 25 ago. 2020.

KADTHUR, J. C. et al. Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours. **Braz J Vet Pathol**, v. 4, n. 1, p. 36–40, 2011.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 1 maio 2006.

KAR, S. et al. Tissue-engineered nanoclay-based 3D in vitro breast cancer model for studying breast cancer metastasis to bone. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 2, p. 119–130, 1 fev. 2019.

KARALIS, T. T. et al. Tumor-suppressive functions of 4-MU on breast cancer cells of different ER status: Regulation of hyaluronan/HAS2/CD44 and specific matrix effectors. **Matrix Biology**, v. 78–79, p. 118–138, 1 maio 2019.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 4, p. 246–252, 1 nov. 2005.

KAROUSOU, E. et al. Collagen VI and hyaluronan: The common role in breast cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

KASZAK, I. et al. Current biomarkers of canine mammary tumors. **Acta Vet Scand**, v. 60, p. 66, 2018.

KATSUMI, A. et al. Integrins in Mechanotransduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12001–12004, 2004.

KAWAI, K. et al. The Activity of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Mammary Tumors of Dogs and Rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 2, p. 105–111, fev. 2006.

KAWASAKI, T. et al. Novel detergent for whole organ tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 10, p. 3364–3373, 1 out. 2015.

- KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25–34, 2015.
- KELLEY, L. C. et al. Traversing the basement membrane in vivo: A diversity of strategies. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 3, p. 291–302, 2014.
- KHARAISHVILI, G. et al. Collagen triple helix repeat containing 1 protein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: an immunohistochemical study. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 11, p. 977–982, 1 nov. 2011.
- KIM, J.-H. et al. Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed Shih Tzu dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 5, p. 1079–1082, 9 set. 2011.
- KIM, S. et al. Evaluation of Mammary Gland Calcification in Dogs; Radiography and Computed Tomography. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 183–192, 29 set. 2017.
- KISCHEL, P. et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 640–650, 1 fev. 2010.
- KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–716, ago. 2004.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- KÖWITSCH, A.; CHHALOTRE, A.; GROTH, T. Effect of Thiolated Glycosaminoglycans on the Behavior of Breast Cancer Cells: Toward the Development of in vitro Models of Cancer. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 18 jan. 2017.
- KWON, S. Y. et al. Laminin 332 expression in breast carcinoma. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 20, n. 2, p. 159–164, 2012.
- LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: J., W. S.; M., V. D. (Eds.). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4^a ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 619–636.
- LANDBERG, G. et al. Patient-derived scaffolds uncover breast cancer promoting properties of the microenvironment. **Biomaterials**, v. 235, n. April 2019, p. 119705, 2020.
- LANGENBACH, A. et al. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424–1428, 2001.
- LAVALLE, G. E. et al. Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. **In Vivo**, v. 26, n. 3, 2012.
- LEBLEU, V. S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, n. 9, p. 1121–

1129, 2007.

LEE, K.-H. et al. Transcriptome Signatures of Canine Mammary Gland Tumors and Its Comparison to Human Breast Cancers. **Cancers**, v. 10, n. 9, p. 317, 7 set. 2018.

LEIVA, M. C. et al. Breast cancer patient-derived scaffolds as a tool to monitor chemotherapy responses in human tumor microenvironments. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 6, p. 4709–4724, 2021.

LEVI, M. et al. Immunohistochemical Expression of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Canine Mammary Hyperplasia, Neoplasia and Supporting Stroma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 4, p. 277–285, 1 nov. 2016.

LI, Y. et al. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 12, p. 2557–2567, 2007.

LIM, H. Y. et al. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. <http://dx.doi.org/10.1177/0300985815579994>, v. 52, n. 6, p. 1045–1051, 16 abr. 2015.

LIU, G. et al. Human breast cancer decellularized scaffolds promote epithelial-to-mesenchymal transitions and stemness of breast cancer cells in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 9447–9456, 2019.

LONDON, C. et al. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 10, n. 3, p. 194–205, 1 set. 2012.

LU, P. et al. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. 1–24, 2011.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012.

LÜ, W. D. et al. Development of an acellular tumor extracellular matrix as a three-dimensional scaffold for tumor engineering. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

LUO, H. et al. Cancer-associated fibroblasts: A multifaceted driver of breast cancer progression. **Cancer Letters**, v. 361, n. 2, p. 155–163, 1 jun. 2015.

LV, Y. et al. Three-dimensional decellularized tumor extracellular matrices with different stiffness as bioengineered tumor scaffolds. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 9, p. 2767–2782, set. 2021.

MA, J. et al. Decellularized Rat Lung Scaffolds Using Sodium Lauryl Ether Sulfate for Tissue Engineering. **ASAIO Journal**, v. 64, n. 3, p. 406–414, maio 2018.

MA, W. et al. Systematic analysis of breast atypical hyperplasia-associated hub genes and pathways based on text mining. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 28, n. 6, p. 507–514, 1 nov. 2019.

MALIK, R.; LELKES, P.; CUKIERMAN, E. Biomechanical and Biochemical Remodeling of Stromal Extracellular Matrix in Cancer. **Trends Biotechnol**, v. 33, n. 4, p. 230–236, 2015.

MALLER, O.; MARTINSON, H.; SCHEDIN, P. Extracellular matrix composition

- reveals complex and dynamic stromal-epithelial interactions in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 301–318, 2010.
- MARETTOVÁ, E.; MARETTA, M. The Distribution of Collagen and Elastic Fibres in the Lactating Bovine Mammary Gland. **Folia Veterinaria**, v. 63, n. 3, p. 60–65, 1 set. 2019.
- MARINKOVICH, M. P. **Laminin 332 in squamous-cell carcinoma** **Nature Reviews Cancer**, 2007.
- MARTÍN-RUIZ, A. et al. Effects of indole-3-carbinol on steroid hormone profile and tumor progression in a mice model of canine inflammatory mammary cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 4 jun. 2018.
- MASON, J. A. et al. Metabolism during ECM Detachment: Achilles Heel of Cancer Cells? **Trends in Cancer**, v. 3, n. 7, p. 475–481, 1 jul. 2017.
- MASOUD, V.; PAGÈS, G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance *World Journal of Clinical Oncology*. **World J Clin Oncol**, v. 8, n. 2, p. 120–134, 2017.
- MAYORCA-GUILLIANI, A. E. et al. Decellularization and antibody staining of mouse tissues to map native extracellular matrix structures in 3D. **Nature Protocols**, v. 14, n. 12, p. 3395–3425, 2019.
- MENDIBIL, U. et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5447, 30 jul. 2020.
- MENDOZA-NOVELO, B. et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1241–1248, 1 mar. 2011.
- 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, 1 jul. 2008.
- MISHRA, D. K. et al. Human Lung Cancer Cells Grown on Acellular Rat Lung Matrix Create Perfusable Tumor Nodules. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 93, n. 4, p. 1075–1081, 1 abr. 2012.
- MISRA, S. et al. Regulation of Multidrug Resistance in Cancer Cells by Hyaluronan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25285–25288, 2003.
- MOLLICA, P. A. et al. 3D bioprinted mammary organoids and tumoroids in human mammary derived ECM hydrogels. **Acta Biomaterialia**, v. 95, p. 201–213, 2019.
- MORGAN, H.; HILL, P. A. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity. **Cancer Cell International**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 8 fev. 2005.
- MOULTON, J. E. et al. Canine Mammary Tumors. **Pathology Veterinary**, v. 4, p. 289–320, 1970.
- MUCHA, J. et al. MDSCs Mediate Angiogenesis and Predispose Canine Mammary Tumor Cells for Metastasis via IL-28/IL-28RA (IFN- λ) Signaling. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103249, 30 jul. 2014.

- MUKARATIRWA, S.; NEDERBRAGT, H. Tenascin and proteoglycans: the role of tenascin and proteoglycans in canine tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 1–8, 1 ago. 2002.
- MURRAY, T. J. et al. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 383–390, 1 abr. 2007.
- MUSCHLER, J.; STREULI, C. H. Cell-Matrix Interactions in Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. a003202–a003202, 1 out. 2010.
- NABA, A. et al. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–23, 2014.
- NAJAFI, M.; FARHOOD, B.; MORTEZAEI, K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2782–2790, 2019.
- NARDI, A. B.; FERREIRA, T. M. M. R.; ASSUNÇÃO, K. A. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. ; NARDI, A. . (Eds.). . **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Gen, 2016. p. 372–377.
- NATAL, R. DE A. et al. Exploring Collagen Parameters in Pure Special Types of Invasive Breast Cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 7715, 22 dez. 2019.
- NEVES, J. DOS S. et al. Influence of different decalcifying agents on EGF and EGFR immunostaining. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 4, p. 484–488, 2011.
- NGUYEN, T.-A.-H. et al. Public Availability of Results of Trials Assessing Cancer Drugs in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 24, p. 2998–3003, 20 ago. 2013.
- NISHIOKA, T.; EUSTACE, A.; WEST, C. Lysyl Oxidase: From Basic Science to Future Cancer Treatment. **Cell Structure and Function**, v. 37, n. 1, p. 75–80, 2012.
- NOGUEIRA, J. C.; CASTRO, A. C. S. Morfologia das glândulas mamárias (mammas) de cadelas. In: CASSALI, G. D. (Ed.). . **Patologia Mamária: do diagnóstico ao tratamento**. 1. ed. São Paulo: Medvet Ltda., 2017. p. 1–15.
- NOLL, J. E.; VANDYKE, K.; ZANNETTINO, A. C. W. The Role of the “Cancer Stem Cell Niche” in Cancer Initiation and Progression. In: **Adult Stem Cell Niches**. [s.l.] InTech, 2014.
- NOWAK, M. et al. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), E-cadherin and Ki-67 in metastatic and non-metastatic canine mammary carcinomas. **Irish veterinary journal**, v. 69, n. 1, 2 ago. 2016.
- NUNES, F. C. et al. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.
- NYANTE, S. J. et al. Quantitative expression of MMPs 2, 9, 14, and collagen IV in LCIS and paired normal breast tissue. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 17 set. 2019.
- O’KEEFE, D.; A. Tumors of the Genital System and Mammary Glands. In:

- ETTINGER; FELDMAN (Eds.). . **Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia: Saunders Company, 1995. p. 1699–1704.
- OCHIAI, K. et al. Endogenous Leu332Gln mutation in p53 disrupts the tetramerization ability in a canine mammary gland tumor cell line. **Oncology Reports**, v. 40, n. 1, p. 488–494, 1 jul. 2018.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66538, 14 jun. 2013.
- OSKARSSON, T. et al. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. **Nat. Med.**, v. 17, n. 7, p. 867–874, 2013.
- OSKARSSON, T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. **Breast**, v. 22, n. S2, p. S66–S72, 2013.
- LOUDIN, M. J. et al. Tumor Cell–Driven Extracellular Matrix Remodeling Drives Haptotaxis during Metastatic Progression. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 516–531, 1 maio 2016.
- OWEN, L. N.; ORGANIZATION, W. H. **TNM Classification of Tumours in Domestic Animals/ edited by L.N. Owen**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/68618>>. Acesso em: 3 mar. 2022.
- PARK, J.; SCHWARZBAUER, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 33, n. 13, p. 1649–1657, 2014.
- PASCOLI, A. L. et al. Campanha de orientação, prevenção e diagnóstico precoce de tumores mamários em cadelas e prevalência desses tumores diagnosticados durante a campanha realizada no município de Blumenau-SC. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 2, p. 66–74, 9 ago. 2017.
- PATSIKAS, M. N.; DESSIRIS, A. The Lymph Drainage of the Mammary Glands in the Bitch: a Lymphographic Study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th Mammary Glands. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 25, n. 2, p. 131–138, jun. 1996.
- PEIN, M.; OSKARSSON, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 309, n. 10, p. C627–C638, 15 nov. 2015.
- PEÑA, L. et al. Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 94–105, 11 jan. 2013.
- PEÑA, L. et al. Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127–145, 13 jan. 2014.
- PEREIRA, C. T. et al. Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs: Can it Really be Altered? **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 32, n. 5, p. 282–290, out. 2003.

- 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 dez. 2014.
- PINTO, M. L. et al. Decellularized human colorectal cancer matrices polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype promoting cancer cell invasion via CCL18. **Biomaterials**, v. 124, p. 211–224, 1 abr. 2017.
- PLACE, A. E.; HUH, S. J.; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 227, p. 1–11, 2011.
- PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2003 4:1, v. 4, n. 1, p. 33–45, 1 jan. 2003.
- PÖSCHEL, A. et al. Identification of disease-promoting stromal components by comparative proteomic and transcriptomic profiling of canine mammary tumors using laser-capture microdissected FFPE tissue. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 23, n. 4, p. 400, 1 abr. 2021.
- PRADO, M. C. M. et al. Investigation of the Prognostic Significance of Vasculogenic Mimicry and Its Inhibition by Sorafenib in Canine Mammary Gland Tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1445, 19 dez. 2019.
- PROVENZANO, P. P. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v. 4, n. 1, p. 38, 26 dez. 2006.
- PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1–15, 2008.
- QIAO, Y. et al. Stimuli-responsive nanotherapeutics for precision drug delivery and cancer therapy. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. e1527, 4 jan. 2019.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 7 nov. 2013.
- QUEIROGA, F. L. et al. Expression of Cox-1 and Cox-2 in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 2–3, p. 177–185, 1 fev. 2007.
- QUEIROGA, F. L. et al. Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 396–403, 1 dez. 2010.
- RANIERI, G. et al. Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in human and pet tumours with special reference to breast cancer: A comparative review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 2, p. 293–308, 1 nov. 2013.
- RASOTTO, R. et al. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571–578, 29 jul. 2017.
- REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 3, p. 233–245, 1 jun. 2007.

REING, J. E. et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8626–8633, 1 nov. 2010.

REIS, J. et al. Microtomographic characterization of calcifications in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 3, p. 281–291, 29 set. 2020.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature** 2001 **414:6859**, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 1 nov. 2001.

RICH, L. et al. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING: A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. **Journal of Morphological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 0–0, 16 jan. 2017.

RIVERA, P. et al. Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8770–8774, 15 nov. 2009.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 132–146, 2011.

ROHANI, M. G.; PARKS, W. C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 113–121, 2015.

ROLLAND, P. H.; JACQUEMIER, J.; MARTIN, P. M. Histological differentiation in human breast cancer is related to steroid receptors and stromal elastosis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 73–77, dez. 1980.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.

RUTNAM, Z. J.; WIGHT, T. N.; YANG, B. B. MiRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. **Matrix Biology**, v. 32, n. 2, p. 74–85, 11 mar. 2013.

SAID, G. et al. Extracellular Matrix Proteins Modulate Antimigratory and Apoptotic Effects of Doxorubicin. **Chemotherapy Research and Practice**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SAKALAUŠKAITĖ, S. et al. VEGF-B, VEGF-A, FLT-1, KDR, ERBB2, EGFR, GRB2, RAC1, CDH1 and HYAL-1 Genes Expression Analysis in Canine Mammary Gland Tumors and the Association with Tumor ClinicoPathological Parameters and Dog Breed Assessment. **Veterinary Sciences** 2021, **Vol. 8, Page 212**, v. 8, n. 10, p. 212, 30 set. 2021.

SALAS, Y. et al. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127381, 18 maio 2015.

SALEEM, A. et al. Analysis of lysyl oxidase as a marker for diagnosis of canine mammary tumors. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 5, p. 4909–4919, 1 out. 2019.

SANTOS, A. et al. Immunohistochemical evaluation of MMP-2 and TIMP-2 in canine mammary tumours: A survival study. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 3, p. 396–402, 1 dez. 2011.

SANTOS, A. A. et al. Matrix metalloproteinase-9 expression in mammary gland tumors in dogs and its relationship with prognostic factors and patient outcome. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 5, p. 689–697, 1 maio 2012.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; FAUSTINO, A. M. R. Histological Study of Canine Mammary Gland During the Oestrous Cycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. e146–e154, 1 out. 2010.

SANTOS, T. R. et al. Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 466–473, jun. 2020.

SCHEDIN, P.; KEELY, P. J. Mammary Gland ECM Remodeling, Stiffness, and Mechanosignaling in Normal Development and Tumor Progression. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. a003228–a003228, 1 jan. 2011.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: Integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 83–92, 2010.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, 1 dez. 1969.

SCHWARTZ, A. M. et al. Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size: A Study of 161 708 Cases of Breast Cancer From the SEER Program. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 138, n. 8, p. 1048–1052, 1 ago. 2014.

SCHWARZBAUER, J. E.; DESIMONE, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–19, 2011.

SILBERSTEIN, G. B.; DANIEL, C. W. Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of serially aged mouse mammary ducts. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 24, n. 2, p. 151–162, 1984.

SILVA, J. A. N. DA. **Matriz extracelular de mama: Caracterização histológica de fibras de colágeno e quantificação de mastócitos**. [s.l.] UNICAMP, 1988.

SILVER, I. A. Symposium on Mammary Neoplasia in the Dog and Cat—I The Anatomy of the Mammary Gland of the Dog and Cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 7, n. 11, p. 689–696, nov. 1966.

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 1 dez. 2011.

SMITH, A. N. The Role of Neutering in Cancer Development. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 44, n. 5, p. 965–975, 1 set. 2014.

SOMERVILLE, R. P. T.; OBLANDER, S. A.; APTE, S. S. Matrix metalloproteinases: Old dogs with new tricks. **Genome Biology**, v. 4, n. 6, p. 1–11, 29 maio 2003.

SONNENSCHN, E. G. et al. Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v. 133, n. 7, p. 694–703, 1991.

SORENMO, K. et al. A prospective randomized trial of desmopressin in canine

mammary carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 4, p. 796–803, 1 dez. 2020.

SORENMO, K. U. 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. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**, p. 604–625, 1 jan. 2019.

SORENMO, U. K.; DEANNA, R. W.; GOLDSMIT, R. H. Tumors of the mammary gland. In: **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. Philadelphia: WB Saunders Company, 2013. p. 553–571.

SOUZA, F. R. et al. Canine Mammary Neoplasms - Evaluation of Tumor Microenvironment. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 50, p. 1853, 24 jan. 2022.

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.

STEPHENS, T. The Use of Chemotherapy to Prolong the Life of Dogs Suffering from Cancer: The Ethical Dilemma. **Animals**, v. 9, n. 7, p. 441, 14 jul. 2019.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 463–516, 28 nov. 2001.

STRATMANN, N. et al. Mammary Tumor Recurrence in Bitches After Regional Mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, p. 82–86, 11 jan. 2008.

SZAUTER, K. M. et al. Lysyl oxidase in development, aging and pathologies of the skin. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 7, p. 448–456, 2005.

TANABE, A. et al. Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine tumours. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 2, p. 577–585, 1 mar. 2021.

TAVASSOLI, A. et al. Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 18, n. 12, p. 1221–7, 1 dez. 2015.

TAYLOR, D. A. et al. Decellularized matrices in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 74, p. 74–89, 1 jul. 2018.

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

THORSETH, M.-L. et al. Uncovering mediators of collagen degradation in the tumor microenvironment. **Matrix Biology Plus**, v. 13, p. 100101, 1 fev. 2022.

TOLG, C. et al. Hyaluronan modulates growth factor induced mammary gland branching in a size dependent manner. **Matrix Biology**, v. 63, p. 117–132, 1 nov. 2017.

TRAN, C. M.; MOORE, A. S.; FRIMBERGER, A. E. Surgical treatment of mammary

- carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, n. 3, p. 252–262, 1 set. 2016.
- TSEGAYE, M. A. et al. Oncogenic signaling inhibits c-FLIPL expression and its non-apoptotic function during ECM-detachment. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 18606, 20 dez. 2021.
- TUER, A. E. et al. Nonlinear Optical Properties of Type I Collagen Fibers Studied by Polarization Dependent Second Harmonic Generation Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 44, p. 12759–12769, 10 nov. 2011.
- TURNER, J. G.; DAWSON, J.; SULLIVAN, D. M. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 8, p. 1021–1032, 15 abr. 2012.
- TUTT, A. et al. Risk estimation of distant metastasis in node-negative , estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. **BMC Cancer**, v. 339, n. 8, p. 1–15, 2008.
- UDABAGE, L. et al. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. **Experimental Cell Research**, v. 310, n. 1, p. 205–217, 15 out. 2005.
- UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature Medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–820, 13 jul. 2010.
- VALDIVIA, G. et al. From Conventional to Precision Therapy in Canine Mammary Cancer: A Comprehensive Review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. February, p. 1–33, 17 fev. 2021.
- VARALLO, G. R. et al. Global gene expression profile in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 254, p. 105393, 1 dez. 2019.
- VAVKEN, P.; JOSHI, S.; MURRAY, M. M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 12, p. 1612–1618, dez. 2009.
- VINOTHINI, G.; BALACHANDRAN, C.; NAGINI, S. Evaluation of molecular markers in canine mammary tumors: Correlation with histological grading. **Oncology Research**, v. 18, n. 5–6, p. 193–201, 2009.
- VON EULER, H. Tumors of the mammary gland. In: **BSAVA manual of canine and feline oncology**. 3^a ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2011. p. 237–247.
- VON EULER, H. et al. A dose-finding study with a novel water-soluble formulation of paclitaxel for the treatment of malignant high-grade solid tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 4, p. 243–255, 1 dez. 2013.
- WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. **Role of extracellular matrix in development and cancer progression**. [s.l.: s.n.]. v. 19
- WANG, Y.; SONG, E. C.; RESNICK, M. B. Elastin in the Tumor Microenvironment. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [S. l.]: Springer, 2020. v. 1272, p. 1–16.

WARNES, C. An update on the risks and benefits of neutering in dogs. **The Veterinary Nurse**, v. 9, n. 3, p. 150–155, 2018.

WEAVER, V. M. et al. The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, n. 6, p. 833–851, 1 dez. 1996.

WEAVER, V. M. et al. Reversion of the Malignant Phenotype of Human Breast Cells in Three-Dimensional Culture and In Vivo by Integrin Blocking Antibodies. v. 137, n. 1, p. 231–245, 1997.

WICHA, M. S. et al. Effects of inhibition of basement membrane collagen deposition on rat mammary gland development. **Developmental Biology**, v. 80, n. 2, p. 253–266, 1980.

WINKLER, J. et al. Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2020.

WISEMAN, B. S. et al. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 162, n. 6, p. 1123–1133, 2003.

WISHART, A. L. et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds identify full-length collagen VI as a driver of breast cancer cell invasion in obesity and metastasis. **Science Advances**, v. 6, n. 43, 23 out. 2020.

WU, W. et al. Hyaluronic acid predicts poor prognosis in breast cancer patients. **Medicine**, v. 99, n. 22, p. e20438, 29 maio 2020.

WU, Z.-S. et al. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2050–2056, 2 jan. 2008.

YANG, J.; BAHCECIOGLU, G.; ZORLUTUNA, P. The Extracellular Matrix and Vesicles Modulate the Breast Tumor Microenvironment. **Bioengineering**, v. 7, n. 4, p. 124, 11 out. 2020.

YANG, X. H. et al. Disruption of Laminin-Integrin-CD151-Focal Adhesion Kinase Axis Sensitizes Breast Cancer Cells to ErbB2 Antagonists. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2256–2263, 15 mar. 2010.

YI, H.-G. et al. A bioprinted human-glioblastoma-on-a-chip for the identification of patient-specific responses to chemoradiotherapy. **Nature Biomedical Engineering**, v. 3, n. 7, p. 509–519, 18 jul. 2019.

YOSHIMURA, H. et al. Increased Presence of Stromal Myofibroblasts and Tenascin-C With Malignant Progression in Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 313–321, 22 jan. 2011.

YU, Q. et al. Fibronectin Promotes the Malignancy of Glioma Stem-Like Cells Via Modulation of Cell Adhesion, Differentiation, Proliferation and Chemoresistance. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 130, 13 abr. 2018.

YUE, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 8, p. S20–S23, 10 dez. 2014.

ZAHREDDINE, H.; BORDEN, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 28, 2013.

ZAMBRANO-ESTRADA, X. et al. Molecular iodine/doxorubicin neoadjuvant treatment impair invasive capacity and attenuate side effect in canine mammary cancer. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 12 mar. 2018.

ZHANG, H. et al. Hyaluronan synthase 2 is an adverse prognostic marker in androgen receptor-negative breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 12, p. 1055–1062, 1 dez. 2016.

ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 1, p. 23–28, 1 mar. 2004.

ZUCCARI, D.; SANTANA, A.; ROCHA, N. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas - revisão. **Clínica veterinária**, v. 32, p. 50–54, 2001.