

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Paulo Edson Baptista Martinelli

**Caracterização do Índice de Cobertura por Pericitos em Neoplasias Mamárias
Caninas e Seu Papel Como Fator Prognóstico**

Pirassununga

2022

Paulo Edson Baptista Martinelli

**Caracterização do Índice de Cobertura por Pericitos em Neoplasias Mamárias
Caninas e Seu Papel Como Fator Prognóstico**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Biociência Animal

Área de Concentração: Prevenção, diagnóstico e terapias inovadoras.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M385 Martinelli, Paulo Edson Baptista
Caracterização do Índice de Cobertura por
Pericitos em Neoplasias Mamárias Caninas e Seu
Papel Como Fator Prognóstico / Paulo Edson Baptista
Martinelli ; orientador Ricardo de Francisco
Strefezzi. -- Pirassununga, 2022.
50 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Microambiente tumoral. 2. Patologia
veterinária. 3. Oncologia. 4. Câncer. 5. Cadelas. I.
Strefezzi, Ricardo de Francisco, orient. II. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "COMPONENTES DO MICROAMBIENTE TUMORAL E SEU VALOR COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM NEOPLASIAS CANINAS", protocolada sob o CEUA nº 7498190221 (ID 001720), sob a responsabilidade de **Ricardo de Francisco Strefeizzi e equipe; Paulo Edson Baptista Martinelli; Ingrid Kester Lima Silva; Jessika Daniel Urel** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 05/07/2021.

We certify that the proposal "Components of the tumour microenvironment and their value as prognostic markers for canine neoplasms", utilizing 1000 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7498190221 (ID 001720), under the responsibility **Ricardo de Francisco Strefeizzi and team; Paulo Edson Baptista Martinelli; Ingrid Kester Lima Silva; Jessika Daniel Urel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 07/05/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 02/2021 a 01/2025Área: Biociência Animal

Origem: Hospital Veterinário UDCH

Espécie: Cães sexo: Machos e Fêmeas idade: 0 a 25 anos N: 1000

Linhagem: qualquer Peso: 0 a 100 kg

Local do experimento: As amostras serão coletadas na Unidade Didática Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (UDCH ? FZEA) e Universidades colaboradoras

Pirassununga, 05 de julho de 2021

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Vice-COordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



ATA DE DEFESA

Aluno: 74135 - 10656095 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do(a) Senhor(a) Paulo Edson Baptista Martinelli no Programa: Biociência Animal, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 15 dias do mês de fevereiro de 2023, no(a) Sala virtual (Online) realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Paulo Edson Baptista Martinelli, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

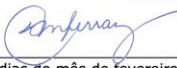
"Caracterização do índice de cobertura por pericitos em neoplasias mamárias caninas e seu papel como fator prognóstico."

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Ricardo de Francisco Strefezzi	Presidente	FZEA - USP	<u>Aprovado</u>
José Guilherme Xavier	Titular	UNIP - Externo	<u>Aprovado</u>
Geovanni Dantas Cassali	Titular	UFMG - Externo	<u>Aprovado</u>

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz , lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 15 dias do mês de fevereiro de 2023.


p/ 
José Guilherme Xavier

p/ 
Geovanni Dantas Cassali


Ricardo de Francisco Strefezzi
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 17/02/2023 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Ciências obtido no Programa Biociência Animal.


Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Prof. Dr. Felipe Percin
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FZEA / USP

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à Deus por ter me mostrado um novo e feliz caminho para a minha vida e que culmina hoje com esta dissertação.

Em segundo lugar, quero agradecer à Geórgia por toda a compreensão e companheirismo nestes anos juntos. À todas palavras de incentivo e de perseverança, mesmo nos momentos difíceis. Obrigado por tudo.

Também agradeço aos meus dois filhos, Gustavo e Henrique, verdadeiros presentes de Deus e que me fazem feliz a cada dia! Papai ama muito vocês.

Ao prof. Ricardo Strefezzi por aceitar me orientar neste projeto! Agradeço imensamente pela compreensão que teve sobre as particularidades que eu apresentei como orientado e pela ajuda em encontrar os caminhos para desenvolvermos este trabalho, tão desafiador e interessante!

À professora Rose da FCAV-Unesp por ceder os blocos desta pesquisa e por me guiar durante a residência neste mundo imenso da patologia veterinária. Um exemplo de pessoa e profissional.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Veterinária, Jéssika, Ingrid, Thiago, Karina, Bethânia, Bruna, Nathália, Giovanna e Johanna, agradeço pela parceria e conversas nestes dois anos. Sem vocês com certeza teria sido mais difícil.

Agradecimento especial à Lindsay, pela ajuda imediata e de diferentes maneiras quando precisei.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP pelo financiamento desta e outras pesquisas do nosso laboratório (número do processo 2020/10582-0).

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

RESUMO

MARTINELLI, P.E.B. **Caracterização do índice de cobertura por pericitos em neoplasias mamárias caninas e seu papel como fator prognóstico.** 2022. 50 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

A angiogênese é um fator importante em tumores mamários caninos e está relacionado à malignidade desta neoplasia. Estudos sobre o papel dos pericitos, células importantes para a estrutura vascular, ainda não foram realizados nas neoplasias mamárias desta espécie e podem ser úteis para o desenvolvimento de terapias contra esta enfermidade. **Objetivos:** Comparar o índice de cobertura por pericitos (PCI) da microvasculatura de diferentes subtipos e graus histológicos de neoplasias mamárias em cadelas e avaliar a relação entre o PCI e a sobrevida dos animais para testar seu valor como fator prognóstico. **Metodologia:** Foram utilizadas 78 amostras histopatológicas de diferentes subtipos de neoplasias mamárias caninas referentes a 54 animais que foram submetidas à imuno-histoquímica por dupla marcação sequencial utilizando anticorpos primários anti-vWF, para marcação de células endoteliais e determinação da densidade microvascular (MVD), e anti- α -SMA, para identificação de pericitos e determinação do PCI (vWF+, α -SMA+ / vWF+, α -SMA-). **Resultados:** O PCI de neoplasias mamárias malignas foi significativamente menor ($p = 0,0135$) que o das benignas (56,93% *versus* 71,21%), mas não houve diferenças entre as MVDs. Posteriormente, os pacientes foram separados em dois grupos utilizando-se o ponto de corte de PCI = 70,16%. Não foram detectadas diferenças significantes entre as curvas de sobrevida dos grupos PCI>70,16% e PCI<70,16%. **Conclusões:** As neoplasias mamárias em cadelas apresentam cobertura de pericitos variável, maior nas neoplasias benignas, o que pode indicar maior estabilidade vascular neste grupo. Não foram detectadas diferenças significantes para o PCI entre os graus histológicos das neoplasias malignas e o PCI não foi considerado um bom fator prognóstico para as neoplasias mamárias.

Palavras-chave: cão, microambiente tumoral, microvasculatura, pericitos, neoplasia mamária.

ABSTRACT

MARTINELLI, P.E.B. Characterization of the pericyte coverage index in canine mammary neoplasms and its role as a prognostic factor. 2022. 50 f. Dissertation (Masters) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

Angiogenesis is an important factor in canine mammary tumours, related to the malignancy of this neoplasm. Research on the role of pericytes, important cells in vascular structure, have not been investigated in mammary neoplasms in this species and may be useful for the development of therapies against this disease.

Objectives: To compare the pericyte coverage index (PCI) of the microvasculature of different subtypes of canine mammary neoplasms and their histological grades and to evaluate the relation between the PCI and survival of the animals to test its value as a prognostic factor. **Methodology:** Seventy-eight histopathological samples from several subtypes of canine mammary neoplasms were submitted to double sequential immunohistochemical staining using an anti-vWF antibody, to identify endothelial cells and determine the microvessel density (MVD), and anti- α -SMA, for the identification of pericytes to calculate the PCI ($vWF+, \alpha$ -SMA+ / $vWF+, \alpha$ -SMA-). **Results:** The PCI of malignant mammary neoplasms was significantly lower ($p=0.0135$) than benign neoplasms (56.93% *versus* 71.21%), but no differences were found between MVDs. Subsequently, the patients were separated in two groups using a cutoff of PCI = 70.16%. No significant differences were detected between the survival curves of the subgroups PCI > 70.16% and PCI < 70.16%. **Conclusions:** Mammary neoplasms in bitches have variable pericyte coverage, higher in benign neoplasms, which might indicate higher vascular stability in this group. No significant differences were found for PCIs between histological grades of malignant neoplasms. Complementary studies are needed to determine if MVD and PCI are prognostic factor for mammary neoplasms in bitches.

Keywords: dog, tumour microenvironment, microvasculature, pericytes, mammary tumours

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
6. RESULTADOS.....	25
7. DISCUSSÃO	35
8. CONCLUSÃO	41
9. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é considerado o segundo maior mercado PET do mundo, respondendo por cerca de 0,36% do produto interno bruto (PIB) nacional e faturando aproximadamente R\$ 20 bilhões no ano de 2020 (ABINPET, 2021). Os serviços veterinários (clínicas e hospitais), bem como os medicamentos a eles relacionados, respondem por 28% deste montante. Tal mercado abrange uma crescente população de cães, com mais de 54 milhões de animais e que, igualmente à população humana, tem aumentado sua expectativa de vida. Conseqüentemente, estão mais expostos a doenças associadas à senilidade, como o câncer.

Alguns estudos indicaram que os óbitos associados ao câncer podem chegar a 45% em animais acima de 10 anos de idade. Diante disso, é compreensível o aumento exponencial dos números de estudos e profissionais focados na oncologia veterinária e com o intuito de compreender todas as facetas da enfermidade.

Dentre as diversas neoplasias caninas, o câncer de mama se destaca pela sua alta prevalência, compreendendo até 50% das neoplasias na espécie. Somam-se a isso, as várias semelhanças do comportamento neoplásico entre cadelas e mulheres, fazendo com que a espécie seja um adequado modelo experimental para estudar o comportamento tumoral em humanos.

O microambiente tumoral é foco de diversos estudos dadas suas diferentes funções para a implantação, manutenção e perpetuação da neoplasia. É uma entidade complexa, que pode variar de acordo com o tipo de câncer e é constituída por diferentes atores como células imunológicas, células estromais, vasos sanguíneos e matriz extracelular e um agente essencial para a oncogênese. Durante a progressão neoplásica uma inter-relação entre as células neoplásicas e as diferentes células que compõem o microambiente tumoral é criada, auxiliando a manutenção do câncer, bem como sua disseminação e produção de metástases.

Para transpor problemas inerentes à disseminação tumoral como a hipóxia e um microambiente ácido, cria-se uma condição pró-angiogênica envolvendo os diferentes componentes do microambiente tumoral a partir da indução da proliferação de células endoteliais com o intuito de reestabelecer os suprimentos

de oxigênio e nutrientes e excretar diferentes metabólitos. Entretanto, a angiogênese tumoral produz vasos sanguíneos intrinsecamente anômalas, com arquitetura débil, que facilitam a progressão e metástase tumorais.

Dentre os diversos fatores observados na angiogênese intratumoral atípica, está a ausência dos pericitos. Estas importantes células para a manutenção e maturação vascular estão ausentes em parte dos vasos sanguíneos do microambiente neoplásico. Diversos estudos em neoplasias em humanos correlacionam este fato a um pior prognóstico. Somado a isso, tem sido sugerido que os pericitos são uma potencial célula-alvo para novas terapias antineoplásicas.

Em oncologia veterinária, a caracterização de pericitos tumorais não foi realizada. Da mesma forma, não foram encontradas pesquisas publicadas em que tenha sido investigada a correlação entre o índice de cobertura por pericitos (PCI) e a sobrevida. Diante disso, o presente estudo foi idealizado com o intuito de caracterizar a cobertura de pericitos intratumoral em neoplasias mamárias de cadelas, avaliar se o PCI é diferente entre tumores benignos e malignos ou entre tipos histológicos e graus de malignidade, bem como avaliar seu valor como indicador prognóstico quanto à sobrevida dos animais tratados cirurgicamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

De acordo com Ferlay *et al.*, (2021), o câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres. É uma enfermidade de grande importância em saúde pública o que gera estudos variados sobre prevenção e diagnóstico precoce com o intuito de reduzir a morbidade e mortalidade relacionadas a ela (HUMPHREY *et al.*, 2002). Em 2020 foram diagnosticados mais de 2 milhões de novos casos de câncer mamário em mulheres e, desde 2008, há 20% de aumento anual de sua incidência juntamente com um aumento de 14% da mortalidade (FERLAY *et al.*, 2021).

Estudos epidemiológicos ao longo das últimas décadas e, mais recentemente, com as publicações sobre o genoma canino, mostraram que esta espécie é altamente susceptível ao desenvolvimento espontâneo de neoplasias (SENHORELLO *et al.*, 2020). Tais características permitiram empregar os cães como modelo comparativo de estudo para neoplasias em humanos, dadas as semelhanças interespecies sobre a carcinogênese, epidemiologia, comportamento genético, clínico e biológico (SHAFIEE *et al.*, 2013) especialmente em neoplasias mamárias.

As neoplasias mamárias são as mais frequentes em cadelas, e entre 50% e 85% das neoplasias diagnosticadas são malignas (NUNES *et al.*, 2018; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010; SENHORELLO *et al.*, 2020), apresentando maior propensão ao seu desenvolvimento fêmeas adultas a idosas, expostas a hormônios (endógenos ou não), não castradas e obesas (DE NARDI, 2016; WEBSTER *et al.*, 2011)

O exame histopatológico ainda é considerado o método de diagnóstico “padrão ouro” para as neoplasias mamárias e é utilizado para classificação e fornecimento de informações prognósticas das cadelas acometidas. Tal classificação é baseada em estudo realizado por Goldschmidt *et al.*, (2011) no qual as neoplasias mamárias foram classificadas em subtipos diferentes de acordo com achados anatomopatológicos das lesões em coloração de rotina (H&E), tendo como base critérios morfológicos padronizados pela Organização Mundial de Saúde para neoplasias mamárias em mulheres (Tabela 1).

Os diferentes subtipos são classificados levando em consideração características morfológicas das neoplasias como o tipo histológico, arquitetura

tecidual, pleomorfismos celular e nuclear, índice mitótico, presença de áreas de necrose intratumorais e invasão de lâmina basal. Esta classificação é de suma importância, por ser reconhecido como um fator prognóstico independente. Recentemente, Canadas *et al.*, (2019) relataram que animais que foram diagnosticados com carcinomas simples, carcinomas complexos e carcinomas em tumor misto apresentaram maior sobrevida quando comparados a animais diagnosticados com carcinossarcoma, resultado semelhante foi obtido por Rasotto *et al.*, (2017) que descreveu sobrevida baixa (3 meses) nos animais acometidos por carcinossarcoma e carcinoma anaplásico.

Tabela 1- Classificação anatomopatológica de neoplasias mamárias em cadelas.

Neoplasias Malignas
Epiteliais
Carcinoma in situ
Carcinoma Simples
a) Tubular
b) Tubulopapilífero
c) Cístico-papilífero
d) Cribriforme
Carcinoma Micropapilar Invasivo
Carcinoma Sólido
Comedocarcinoma
Carcinoma Anaplásico
Carcinoma surgido de Adenoma/Tumor Misto
Carcinoma Complexo
Carcinoma e Mioepitelioma Maligno
Carcinoma em Tumor Misto
Carcinoma Ductal
Carcinoma Papilar Intraductal
Mesenquimais
Osteossarcoma
Condrossarcoma
Fibrossarcoma
Hemangiossarcoma
Outros Sarcomas
Carcinomas Especiais
Carcinoma de Células Escamosas
a) Variante fusiforme
Carcinoma Adenoescamoso
Carcinoma Mucinoso

Mioepitelioma Maligno
 Carcinoma Inflamatório

Neoplasias

Benignas/Hiperplasias/Displasias

Adenoma Simples
 Adenoma Papilar Intraductal
 Adenoma Ductal
 Fibroadenoma
 Mioepitelioma
 Adenoma Complexo
 Tumor Misto Benigno
 Ectasia Ductal
 Adenose
 Epiteliose
 Papilomatose
 Ginecomastia

Neoplasias de Mamilo

Adenoma
 Carcinoma
 Carcinoma com Infiltração Dérmica
 Melanose

Fonte: GOLDSCHMIDT et al., (2011)

Os critérios morfológicos para graduação de acordo com o Sistema de Graduação de Nottingham (ELSTON & ELLIS 1998) estão apresentados na Tabela 2. As variáveis observadas microscopicamente (formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico) são pontuadas e somadas, quando notadas em áreas de invasão, gerando um escore que permite classificar as neoplasias de grau I (bem diferenciadas) a grau III (pouco diferenciadas).

Tabela 2: Critérios Morfológicos para Graduação Histopatológica

Pontos	Formação Tubular	Pleomorfismo Nuclear	Número Mitoses
1	> 75% da amostra	Núcleos uniformes, pequenos nucléolos visíveis	0-9 mitoses
2	Moderada (10-75%) da amostra	Moderada atipia nuclear, núcleos hiper Cromáticos, nucléolos proeminentes	10-19 mitoses
3	< 75% da amostra	Acentuada atipia, nuclear, multinucleação, e nucléolos proeminentes	> 20 mitoses

Fonte: (ELSTON and ELLIS, 1998)

Tabela 3 - Graduação Histológica de Malignidade de Neoplasias mamárias

Escore Total	Grau de Malignidade
3 a 5	I (Baixo Grau – bem diferenciada)
6 a 7	II (moderadamente diferenciado)
8 a 9	III (Alto Grau - pouco diferenciada)

Fonte: (ELSTON and ELLIS, 1998)

O diagnóstico e o prognóstico de neoplasias mamárias são realizados associando-se estes diversos critérios morfológicos do exame histopatológico ao método imuno-histoquímico, permitindo a investigação de proteínas específicas que, por vezes, são indicadores prognósticos e preditivos. Entretanto, ainda há muita heterogeneidade entre estudos imuno-histoquímicos para as neoplasias mamárias em cães, principalmente devido à variada quantidade de marcadores utilizados para os mesmos fins, o que dificulta comparações entre estudos (PEÑA *et al.*, 2013).

Por este motivo, e baseando-se em diferentes pesquisas e opinião de

profissionais veterinários de diferentes áreas, o Consenso Brasileiro sobre o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores Mamários de Caninos e Felinos, em 2019, padronizou o uso de alguns marcadores a serem pesquisados em tumores mamários para uso como fatores prognósticos e preditivos (CASSALI *et al.*, 2020).

De acordo com esta padronização, o painel imuno-histoquímico para carcinomas mamários caninos deve pautar-se nas expressões dos receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), de Ki-67 e de ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Os receptores hormonais (RE e RP) são considerados indicadores da capacidade de progressão das células neoplásicas e existe uma relação inversa entre a expressão destes receptores e a o comportamento neoplásico. Assim, em carcinomas mamários a menor expressão dos receptores hormonais está relacionada a maior tamanho tumoral, a subtipos histológicos mais agressivos e menor sobrevida do paciente (COSTA *et al.*, 2002; GERALDES *et al.*, 2000).

O Ki-67 é um indicador de proliferação celular que apresenta correlação negativa com a expressão de RP nas neoplasias mamárias de cadelas menos diferenciadas (CASSALI, 2000). É um importante parâmetro prognóstico das lesões mamárias e sua expressão aumenta conforme o grau histológico, indicando menor tempo de sobrevida.

Associado ao painel imuno-histoquímico, faz-se necessária a realização do estadiamento tumoral, que é estimado de acordo com a observação clínica com o auxílio de ferramentas diagnósticas complementares. É estabelecido de acordo com o “Sistema TNM” (T = Tamanho Tumoral; N = Envolvimento de Linfonodo Regional; M = Presença de Metástases Distantes). Este sistema foi proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é utilizado para definir a extensão e gravidade do câncer (OWEN, 1980), apresentando adaptações de acordo com o tipo neoplásico.

Para as neoplasias mamárias em cadelas, utilizam-se três variáveis independentes conforme descrito na Tabela 4. Cavalcanti (2006) demonstrou que tumorações que mediam 3 cm ou menos, em animais sem metástases nodais ou à distância, apresentavam melhor prognóstico e maior sobrevida quando comparada a animais que apresentavam neoplasias maiores, com metástase nodal e à distância.

Tabela 4 - Estadiamento clínico (TNM) dos tumores mamários caninos

Estadio	Tamanho Tumoral	Status Nodal	Metástase
I	T1<3cm	N0	M0
II	T2 3-5 cm	N0	M0
III	T3 > 5cm	N0	M0
IV	Qualquer Tamanho	N1	M0
V	Qualquer Tamanho	Qualquer N	M1

Fonte: (OWEN, 1980) (Adaptado)

O microambiente tumoral (MAT) é definido como o conjunto de células cancerosas ou não, associadas a diferentes elementos da matriz extracelular, que interagem entre si e influenciam a perpetuação da doença (ANDERSON; SIMON, 2020). Destacam-se células estromais como fibroblastos, células mioepiteliais, pericitos, células endoteliais sanguíneas e linfáticas, adipócitos, células dendríticas, além de leucócitos e componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina e outros ((JAHANBAN-ESFAHLAN; SEIDI; ZARGHAMI, 2017; LI *et al.*, 2021). Neste nicho, vias complexas e redes de sinalização intercelulares, bem como interações com componentes não-celulares, levam ao crescimento e progressão tumorais, geralmente resultando em baixa resposta a terapias e resistência a diferentes medicamentos (BAGHBAN *et al.*, 2020).

As células do sistema imune são críticas para o desenvolvimento neoplásico. Atuam de maneira dicotômica pois podem ser indutoras do crescimento tumoral ou supressoras, além de terem a capacidade de produzir moléculas de sinalização como o fator de crescimento para o endotélio vascular (VEGF), um importante indutor de angiogênese tumoral. Os fibroblastos associados ao câncer também são importantes componentes do MAT e têm papel crucial no desenvolvimento tumoral por facilitar a comunicação entre as células neoplásicas e demais componentes do nicho neoplásico através da secreção de fatores de crescimento e citocinas, que estão relacionados à angiogênese, proliferação, e mecanismos de invasão e metástase (ANDERSON; SIMON, 2020; LI *et al.*, 2021).

O endotélio vascular é composto de uma fina e única camada celular que

reveste os vasos sanguíneos. A vasculatura no MAT tem como funções o transporte de água e nutrientes às células, manutenção homeostática e transporte de células inflamatórias (JIANG *et al.*, 2020).

Estudo realizado por Folkman (1974, p. 2109 apud Algire & Chalkley, 1945, p. 73-85) revelou que em tumores sólidos as células endoteliais correspondem a até 40% do tamanho total da neoplasia e que sua proliferação ocorre a partir de vasos sanguíneos pré-existentes no microambiente tumoral. A este processo denominou-se angiogênese tumoral.

Diversos ensaios sobre as características da angiogênese tumoral e sua correlação com metástases e prognóstico em tumores sólidos de mulheres foram desenvolvidos posteriormente, além de muitos outros de oncologia comparada (MENG *et al.*, 2015). Costuma-se utilizar a densidade microvascular (*microvessel density* – MVD) como métrica, associando uma maior MVD a neoplasias mais agressivas e de pior prognóstico. Cao *et al.*, (2013) demonstraram que a alta MVD e a presença de vasos sanguíneos menos diferenciados estavam diretamente relacionados a carcinomas renais de maior grau e pior prognóstico. Resultados semelhantes foram obtidos por Yan *et al.* (2008), He *et al.* (2015) e Kraby *et al.*, (2017) em carcinomas colorretais, carcinomas ovarianos e carcinomas mamários, respectivamente.

Na medicina veterinária, estudos de Graham & Myers (1999), Lavallo *et al.*, (2010) e Sleenckx *et al.* (2014) também encontraram relação direta entre a MVD, o grau histológico e o prognóstico em mastocitomas e neoplasias mamárias em cadelas, enquanto Diessler *et al.* (2017) correlacionou a maior MVD à maior probabilidade de êmbolos neoplásicos e metástases nodais em tumores de mama caninos. Já em referência à localização da microvasculatura tumoral, estudo recente indicou que sua disposição é principalmente peritumoral (SOUZA *et al.*, 2022).

A angiogênese tumoral é um processo necessário para o desenvolvimento tumoral, entretanto, devido a um desbalanço ainda pouco compreendido entre fatores pró e antiangiogênicos, a vasculatura das neoplasias apresenta características morfológicas peculiares, como grande tortuosidade, grande permeabilidade vascular e força compressiva (LI *et al.*, 2021) e, neste cenário, os pericitos emergem como célula importante para o controle do MAT.

Associado contiguamente ao endotélio vascular, temos os pericitos, células cuja importância na modulação de diferentes doenças, dentre elas o câncer, tem sido alvo de estudos ao longo da última década. Estas células foram descritas no século XIX e, inicialmente, acreditava-se que tinham apenas papel de suporte à vasculatura. Atualmente, sabe-se que possuem diferentes papéis no metabolismo, além de serem cruciais para a estabilização e sobrevivência dos vasos sanguíneos neoformados como arteríolas, vênulas e capilares, tanto em condições fisiológicas como em doenças. Estas células compartilham características de macrófagos e musculatura lisa, podendo atuar como importante agente imunomodulador em doenças neoplásicas, vasculares e cerebrais (LIU; YANG; FAN, 2020)

Estruturalmente, estão localizados contiguamente à membrana basal dos capilares, intimamente opostos às células endoteliais, ao passo que vasos calibrosos como artérias e veias são cobertas por células musculares lisas (CMLs). Ambos os tipos celulares, pericitos e CMLs, são denominados de células murais (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003; YAMAZAKI; MUKOUYAMA, 2018). A cobertura de pericitos ocorre na vasculatura de todo o organismo de maneira desigual a depender do órgão. A área com maior cobertura de pericitos nos vasos sanguíneos é a barreira hematoencefálica, com proporções de células endoteliais/pericitos variando entre 1:1 a 1:3, enquanto que este índice cai exponencialmente na musculatura estriada esquelética (1:100) (DÍAZ-FLORES et al., 2009; MATHIISEN et al., 2010).

Estudo realizado por Birbrair et al. (2014) confirmou haver dois tipos de pericitos, denominados pericitos tipo-1 e tipo-2, que executam tarefas totalmente distintas tanto fisiologicamente quanto nas enfermidades. Enquanto os pericitos tipo-1 são capazes de originar outras células tais como adipócitos e fibroblastos, mas não células de linhagem neuronal, pericitos tipo-2 estão associados à grande capacidade de produção de linhagens neuronal e de musculatura. Outrossim, os mesmos autores indicaram que os pericitos tipo-2 também estão associados à angiogênese tumoral e que a interação endotélio-pericito induz a aumento da permeabilidade vascular, aumento da taxa de invasão e, conseqüentemente, metástases.

Durante a angiogênese, estas células são responsáveis por secretar fatores de crescimento que estimulam, via reguladores parácrinos e agentes vasoativos, o desenvolvimento das células endoteliais a partir de vasos sanguíneos já existentes

e, paralelamente, produzem proteases com o intuito de modular a matriz extracelular circundante e para facilitar a migração de novos vasos sanguíneos (RIBEIRO; OKAMOTO, 2015a; ZHAO; CHAPPELL, 2019). Em contrapartida, estes novos vasos sanguíneos formados liberarão fatores para recrutamento de novos pericitos que realizarão a função de remodelamento, maturação e estabilização vascular (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; GERHARDT; SEMB, 2008).

Na angiogênese tumoral, da qual participam apenas pericitos tipo-2, ocorre evento similar à fisiológica, em que a neovascularização é precedida pelo recrutamento e migração dos pericitos (BIRBRAIR *et al.*, 2014; RIBEIRO; OKAMOTO, 2015). No entanto, através de mecanismos ainda pouco compreendidos, a arquitetura vascular não atinge a maturação completa, levando a desordens arquiteturais, sendo mais tortuosos, mais permeáveis e apresentando mais alterações funcionais, como ausência ou diminuição da cobertura por pericitos (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; BIRBRAIR *et al.*, 2014; HOSAKA *et al.*, 2016; MORIKAWA *et al.*, 2002). Estas anormalidades medeiam fluxo sanguíneo caótico, suportando, em teoria, a disseminação vascular das células tumorais e dificultando a difusão de medicamentos quimioterápicos (GOEL *et al.*, 2013).

A imaturidade vascular e ausência de pericitos foi relacionada à maior agressividade neoplásica, incidência de metástases e pior prognóstico em humanos com carcinoma colorretal (YONENAGA *et al.*, 2005). Em contrapartida, Gee *et al.*, (2003) demonstraram maior cobertura vascular por pericitos associada a tumores mais agressivos, maior resistência a terapias adjuvantes e pior prognóstico em melanoma e carcinoma renal.

A avaliação do PCI em tumores mamários humanos apresentou porcentagens que variaram de 13% a 88%, sugerindo que o câncer de mama é uma das neoplasias sólidas cuja cobertura por pericitos da microvasculatura é mais robusta, indicando uma alta necessidade de angiogênese para progressão deste tipo de câncer (EBERHARD, 2000; KIM, 2019; KIM *et al.*, 2016b; SHRIVASTAV *et al.*, 2016).

Embora tenha ocorrido grande evolução no estudo das características ultraestruturais desta célula nos últimos tempos, ainda não é possível confirmar todas as suas características moleculares e isso se reflete na grande gama de

marcadores imuno-histoquímicos utilizados para sua identificação e expressão. Em 2003, Gerhardt & Betsholtz afirmaram que “não existe um pan-marcador de pericitos” e, passados quase vinte anos, este dilema ainda persiste. Atualmente, os diversos estudos imuno-histoquímicos com esta célula têm usado anticorpos combinados como α -SMA, desmina, PDGFR- β , NG2, RGS-5 e CD248 (ARMULIK; GENOVÉ; BETSHOLTZ, 2011; SHRIVASTAV *et al.*, 2016; YONENAGA *et al.*, 2005; ZHAO; CHAPPELL, 2019). A escolha do anticorpo varia de acordo com algumas características como o tecido a ser estudado, a espécie e o contexto a que foi submetida a amostra (GERHARDT & BETSHOLTZ, 2003).

O α -SMA é o marcador imuno-histoquímico mais utilizado nos estudos devido à sua abundância apesar de também ser um marcador de miofibroblastos o que poderia ser um fator de dificuldade para a caracterização desta célula (KIM, 2019). Em 2002, Morikawa *et al* indicaram que o α -SMA não era expresso em pericitos quiescentes de tecidos normais. Gerhardt & Betsholtz (2003) indicaram que a expressão α -SMA ocorria apenas em células murais maduras e tal dado foi confirmado por Wang *et al.* (2006) que provaram que pericitos expressavam proteínas anti- α -SMA. Recentemente, Natarajan *et al.* (2022) demonstraram que grande parte dos vasos sanguíneos intratumorais em cânceres pancreáticos expressam o α -SMA, fenômeno este induzido pelas células cancerosas.

A caracterização da microvasculatura e o papel dos pericitos ainda é fonte de estudos (SCOTT *et al.*, 2015) e este interesse se dá principalmente nos resultados muitas vezes frustrantes dos tratamentos oncológicos utilizando-se drogas antiangiogênicas (JIANG *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2015). Este tipo de terapia lança mão de moléculas que inibem a via de sinalização do VEGF, destruindo a vasculatura e, em última instância, matando as células tumorais (KIM, 2019).

No entanto, ensaio realizado por Li *et al.*, (2018) relatou casos de resistência neoplásica aos medicamentos inibidores da angiogênese e há suspeitas de que os pericitos atuem como figura central deste mecanismo de resistência. Franco *et al.* (2011) sugeriram que os pericitos podem proteger as células endoteliais destas terapias secretando fatores pró-angiogênicos, enquanto que Bergers & Hanahan (2008), em estudo pré-clínico, observaram que os pericitos aumentavam a sua cobertura perivascular de maneira adaptativa e, por seguinte,

induziam resistência às medicações.

Em medicina veterinária, não foram encontrados estudos sobre pericitos em neoplasias. A sua importância na microvasculatura e no desenvolvimento tumoral já estão evidenciados em neoplasias renais, ováricas, de cólon em seres humanos e atualmente são fonte de pesquisa para diferentes terapias antiangiogênicas.

A hipótese deste estudo é que os vasos sanguíneos de neoplasias mamárias caninas menos diferenciadas apresentem menor cobertura por pericitos, semelhante ao observado em mulheres, o que pode indicar a ocorrência de angiogênese imperfeita e estar associada a maiores taxas de morte e menor tempo de sobrevida devido ao câncer.

3. OBJETIVOS

- Caracterizar a microvasculatura sanguínea de neoplasias mamárias de cadelas quanto ao Índice de cobertura Microvascular por Pericitos (PCI);
- Comparar os PCIs de neoplasias mamárias benignas com os de neoplasias mamárias malignas;
- Comparar os PCIs entre os graus histológicos;
- Verificar o valor do PCI como indicador prognóstico quanto à sobrevida;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de neoplasias mamárias foram obtidas junto ao Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA-USP) e ao arquivo histopatológico do Setor de Patologia Veterinária das Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, totalizando 78 neoplasias em 54 animais. O acompanhamento clínico destes animais foi realizado de maneira retrospectiva e prospectiva, por meio de pesquisa em prontuários e entrevistas com proprietários e/ou veterinários responsáveis. Foram incluídos no estudo os casos que continham material em quantidade e qualidade adequadas para imuno-

histoquímica e dados sobre evolução clínica por um período mínimo de 180 dias para casos censurados pela análise estatística. O acompanhamento dos diferentes animais foi realizado levando em consideração o subtipo histológico mais agressivo, em casos de neoplasias múltiplas. Foram censurados na análise estatística os animais que morreram por causas não relacionadas ao tumor e vivos ao final do estudo.

As amostras foram coradas pelo método da H&E, revisadas e classificadas, por três observadores de maneira simultânea, segundo Goldschmidt et al. (2011). Tal observação em lâminas de rotina também foi utilizada para seleção dos fragmentos destinados à imuno-histoquímica.

A técnica de imuno-histoquímica escolhida foi a de dupla marcação sequencial, respeitando as recomendações específicas dos fabricantes para cada anticorpo. Resumidamente, cortes histológicos de aproximadamente 4 μm foram aderidos a lâminas silanizadas, desparafinados em estufa e imersos em xilol para posterior re-hidratação em álcool graduado. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, por 3 minutos, em solução comercial de Tris/EDTA pH 9.0 (Envision Flex Target Retrieval Solution High pH, Dako®). O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado em solução comercial de Peróxido de Hidrogênio a 3% (EasyPath®) e o bloqueio de ligações proteicas inespecíficas foi realizada por solução comercial (Protein Block Serum-Free Ready-to-Use, EasyPath®).

Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-vWF (policlonal de coelho, código IR527, em solução pronta para uso, Dako®), para marcação de células endoteliais por 60 minutos à temperatura ambiente em câmara escura e úmida. O anticorpo secundário (Easylink One, Erviegas®) foi aplicado por 20 minutos e a reação foi revelada pelo cromógeno 3,3'- Diaminobenzidina (DAB). Posteriormente à primeira reação, as lâminas foram tratadas por solução de Ácido Sulfúrico 0,2 M por 3 minutos com o intuito de retirar o excesso de anticorpo secundário da primeira reação e evitar ligações indesejadas deste com o segundo anticorpo primário que foi aplicado posteriormente (PETERSEN et al., 2018). Esta etapa se deve ao uso do mesmo anticorpo secundário para ambas reações imuno-histoquímicas. Em seguida, foi realizado novo bloqueio de peroxidases endógenas e incubação com o segundo anticorpo primário, anti- α -actina de músculo liso

(monoclonal de camundongo, Clone HHF35, pronto para uso, Dako®), por 60 minutos à temperatura ambiente em câmara escura e úmida, seguida de nova incubação com o anticorpo secundário (Easylink One, Dako®), por 20 minutos. A segunda reação foi revelada pelo cromógeno Magenta (Envision Flex HRP Magenta Chromogen, Dako®) e as lâminas seguiram para contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1,5 minutos, seguida por passagem em gradações crescentes de álcool, xilol e montagem com resina sintética e lamínula. As lâminas controle negativo foram processadas substituindo os anticorpos primários por tampão. O controle positivo foi realizado dentro da própria reação imuno-histoquímica, observando-se marcação endotelial, de plaquetas e leucócitos para o anticorpo anti-vWF e da camada média das arteríolas e células mioepiteliais dos lóbulos mamários para a alfa-actina de músculo liso. Todas as etapas de lavagem foram realizadas com tampão PBS pH 7,6.

O PCI foi determinado calculando-se a porcentagem de microvasos peritumorais duplamente marcados (VWF+/ α SMA+) pelo total de capilares observados (VWF+/ α SMA- + VWF+/ α SMA+). Para tanto, foram selecionados capilares e vênulas de até 50 μ m de diâmetro (GRAHAM & MYERS, 1999) sendo contabilizada qualquer célula endotelial ou agregados celulares marcados com DAB. As contagens foram realizadas em 5 campos de alta concentração (“*hot spots*”), à objetiva 40x. As áreas selecionadas foram capturadas em microscópio (Leica® DM500) acoplado a câmera digital de alta resolução (Leica®, ICC50HD). As cinco imagens utilizadas cobriram uma área total de 0,40 mm². Foram evitadas grandes áreas de inflamação, áreas de necrose e de tecido não-neoplásico.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os PCIs foram comparados entre tumores malignos e benignos por meio do teste de Mann-Whitney e entre os tipos histológicos por meio do teste de Kruskal-Wallis. As correlações entre os indicadores prognósticos e o tempo de sobrevida foram analisadas pelo Teste de Correlação de Spearman. A sobrevida pós-cirúrgica foi analisada pelo método de Kaplan-Meier seguido de teste de Mantel-Cox (*logrank*). Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software

GraphPad Prism® (versão 8 para macOS, GraphPad software, Inc.) e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

6. RESULTADOS

O diagnóstico, a classificação, a graduação histológica e imuno-histoquímica bem como informações foram coletadas 78 amostras de 54 animais, conforme a tabela 5. Para a caracterização da cobertura por pericitos foram utilizadas, por vezes, amostras de diferentes diagnósticos morfológicos provenientes do mesmo animal. Nestes casos, para a realização das correlações de sobrevivência, assumiu-se a neoplasia mais agressiva para efeitos estatísticos, excluindo-se as outras.

A média de idade média dos animais do estudo foi de $10,27 \pm 2,14$ anos e as lesões estavam distribuídas em mamas torácicas craniais e caudais 23/78 (29%), mamas abdominais craniais e caudais 40/78 (51%) e mamas inguinais 17/78 (20%).

Tabela 5 – Relação das amostras analisadas em função do diagnóstico histopatológico, grau e dados clínicos gerais dos animais.

Animal	Idade	Local	Diagnóstico	Grau	Classificação
1	12	M3D	Adenoma Simples	0	Benigno
2	14	M4D	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
3	6	M4E	Adenoma Simples	0	Benigno
4	8	M4E	Adenoma Complexo	0	Benigno
5	12	M4E	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
6	12	M4E	Carcinoma Complexo	1	Maligno
6	12	M1D	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
7	8	M2D	Carcinoma Complexo	0	Maligno
7	8	M1D	Adenoma Simples	0	Benigno
7	8	M4E	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
8	12	M3E	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
8	12	M4E	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
9	8	M2D	Carcinoma Complexo	0	Maligno
10	10	M4D	Carcinoma Complexo	1	Maligno
11	8	M4E	Adenoma Ductal	0	Benigno
12	14	M3E	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
12	14	M5E	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
13	11	M3D	Carcinoma Complexo	1	Maligno
14	12	M2D	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
15	11	M4E	Carcinoma Simples tubular	2	Maligno
15	11	M2E	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
16	4	M4D	Fibroadenoma	0	Benigno
17	7	M2E	Adenoma Simples	0	Benigno
17	7	M3E	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
18	9	M5E	Adenoma Simples	0	Benigno
19	11	M5E	Carcinoma Complexo	1	Maligno
20	13	M2D	Carcinoma em Tumor Misto	3	Maligno

21	11	M4D	Carcinoma Micropapilar	1	Maligno
22	11	M3E	Carcinoma <i>In situ</i>	1	Maligno
23	11	M4D	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
23	11	M5D	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
24	9	M3E	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
25	8	M1E	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
26	8	M2E	Carcinoma Complexo	0	Maligno
27	3	M4E	Carcinoma Sólido	3	Maligno
28	9	M5E	Adenoma Simples	0	Benigno
29	12	M1D	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
30	8	M5D	Comedocarcinoma	3	Maligno
30	8	M5D	Comedocarcinoma	2	Maligno
30	8	M5D	Comedocarcinoma	3	Maligno
31	16	M5D	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
31	16	M4D	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
32	12	M2D	Carcinoma Anaplásico	3	Maligno
33	10	M4E	Adenoma Simples	0	Benigno
33	10	M3D	Carcinoma Sólido	2	Maligno
34	10	M5E	Carcinoma Complexo	1	Maligno
35	13	M3D	Carcinoma Complexo	1	Maligno
35	13	M4E	Carcinoma Simples Papilar	1	Maligno
36	11	M3D	Carcinoma Simples tubular	2	Maligno
36	11	M1E	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
37	11	M5E	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
38	9	M3E	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
38	9	M3E	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
39	6	M4E	Carcinoma <i>In situ</i>	1	Maligno
40	8	M2E	Carcinoma <i>In situ</i>	1	Maligno
40	8	M3E	Tumor Misto Benigno	0	Benigno
41	8	M4E	Carcinoma Cribriforme	3	Maligno
42	12	M5D	Carcinoma Complexo	1	Maligno
43	4	M1E	Adenoma Complexo	0	Benigno
44	11	M4D	Carcinoma Simples Papilar	2	Maligno
44	11	M4E	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
44	11	M4D	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
45	11	M4D	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
45	11	M5E	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
46	12	M5D	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
47	14	M2D	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
48	S/I	M2E	Carcinoma Complexo	0	Maligno
48	S/I	M5E	Carcinoma Complexo	2	Maligno
49	10	M4E	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
49	10	M5D	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
50	15	M2D	Carcinoma Complexo	3	Maligno
50	15	M3E	Carcinoma Complexo	3	Maligno
50	15	M1E	Carcinoma em Tumor Misto	3	Maligno
50	15	M4E	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
51	10	M5E	Tumor Misto Benigno	0	Benigno
52	7	M4D	Carcinoma Micropapilar	2	Maligno
53	11	M3D	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
54	10	M2D	Adenoma Simples	0	Benigno

Legenda: M1D/E: Mama torácica cranial direita/esquerda; M2D/E: Mama torácica caudal direita/esquerda; M3D/E: Mama abdominal cranial direita/esquerda; M4D/E: Mama

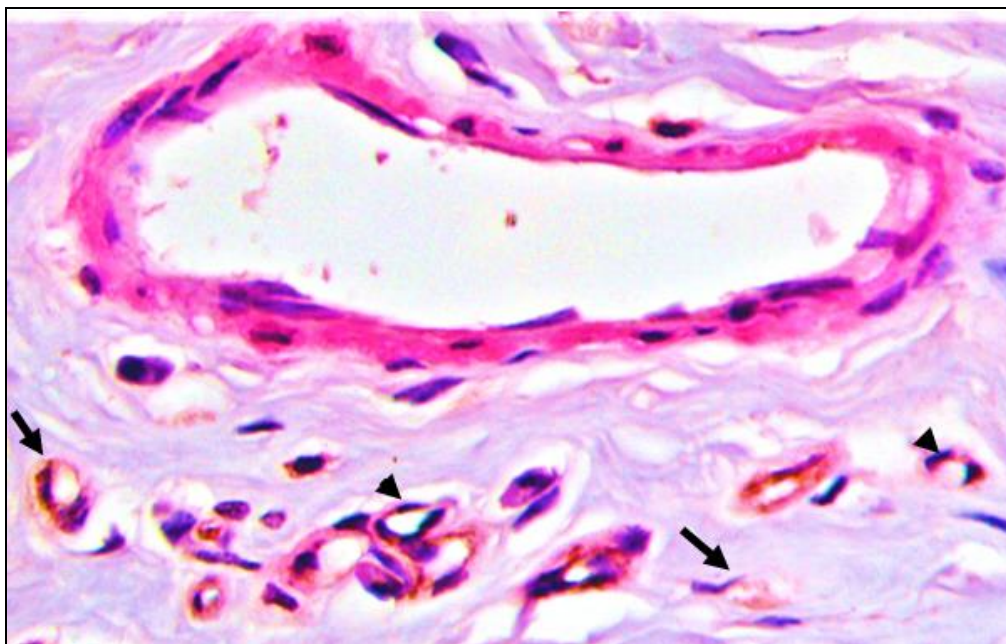
abdominal caudal direita/esquerda; M5D/E: Mama inguinal direita/esquerda. S/I: Sem informações.

Fonte: Arquivo Pessoal

Dentre as neoplasias benignas, o adenoma simples foi o mais frequente, correspondendo por 7/18 (38%), seguido pelo adenoma complexo 6/18 (33%) enquanto que dentre as neoplasias malignas o carcinoma tubulopapilífero apresentou maior incidência 15/60 (25%), seguido pelo carcinoma em tumor misto 12/60 (20%). Com relação ao grau histológico das neoplasias malignas, os tumores de grau I corresponderam a 53% (32/60), seguidos pelos de grau II 32% (19/60) e grau III 15% (9/60).

As imunomarcações duplas sequenciais foram positivas para todas as amostras do estudo e a sua marcação e controle interno podem observadas na Figura 2. O tipo de microvasculatura contabilizada, o controle positivo e os valores observados para cada uma das neoplasias analisadas são apresentadas nas Figuras 2 e 3 e na Tabela 6.

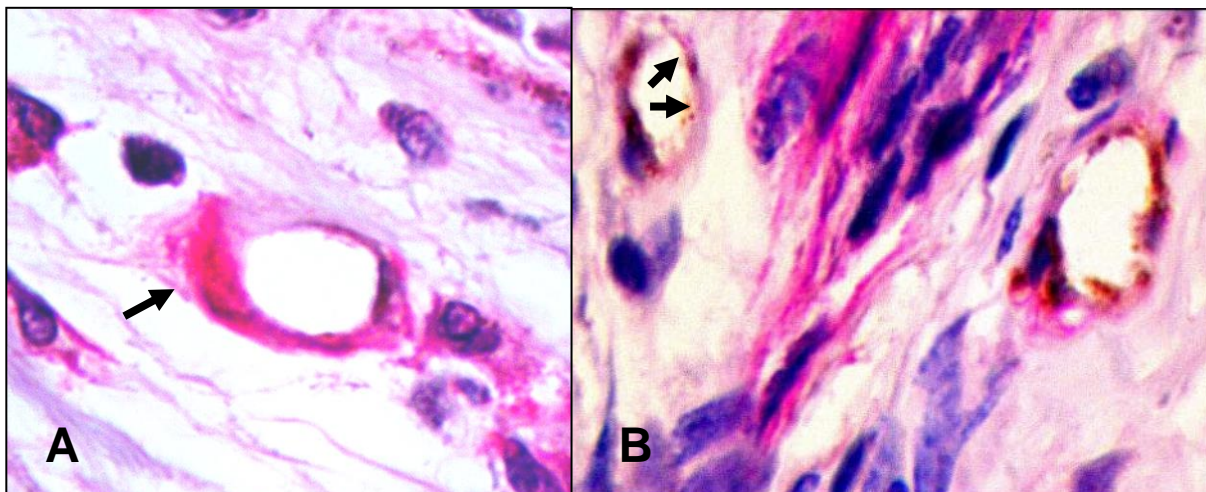
Figura 2: Caracterização imuno-histoquímica dupla marcação para microvasculatura.



Legenda: A) Controle positivo dentro da reação imuno-histoquímica marcação de endotélio vascular (DAB, marrom) e musculatura lisa ou morfologicamente indicativa de pericitos (magenta). Setas pretas indicam marcação de microvasculatura por anti-vWF e revelado pelo cromógeno DAB. Marcação de microvasculatura associada à cobertura vascular por células indicativas de pericitos (cabeça de seta-preta). (Obj 100X)

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 3: Caracterização da microvasculatura peritumoral com apresentando células de cobertura vascular morfologicamente indicativa de pericitos (α -SMA+/VWF+) e sem cobertura de pericitos (α -SMA-/ VWF+).



Legenda: A) Microvaso com cobertura de célula morfologicamente indicativa de pericito (seta), coloração magenta. B) Microvaso sem cobertura de pericito (setas) notar marcação endotelial com cromógeno DAB (Obj. 100X).

Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 6 - Contagem da Densidade Microvascular Média (MVD), Índice de Cobertura Vascular Morfologicamente Indicativa de por Pericitos (PCI), Diagnóstico Histopatológico, Grau e classificação das neoplasias mamárias.

Animal	Densidade Microvascular Média (MVD)	Índice de Cobertura vascular de células morfologicamente indicativas de pericito (PCI%)	Diagnóstico	Grau	Classificação
1	10,4	88,46	Adenoma Simples	0	Benigno
2	11,8	76,27	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
3	11,2	71,43	Adenoma Simples	0	Benigno
4	19,0	76,84	Adenoma Complexo	0	Benigno
5	7,8	74,36	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
6	5,8	75,86	Carcinoma Complexo	1	Maligno
6	7,2	77,78	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
7	10,8	62,96	Carcinoma Complexo	0	Maligno
7	4,0	85,00	Adenoma Simples	0	Benigno
7	9,2	63,04	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
8	9,4	85,11	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
8	24,6	78,86	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
9	16,2	76,54	Carcinoma Complexo	0	Maligno

10	10,0	52,00	Carcinoma Complexo	1	Maligno
11	6,4	65,63	Adenoma Ductal	0	Benigno
12	12,4	40,32	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
12	9,2	67,39	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
13	12,6	49,21	Carcinoma Complexo	1	Maligno
14	10,0	66,00	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
15	12,4	64,52	Carcinoma Simples tubular	2	Maligno
15	7,2	52,78	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
16	10,6	35,85	Fibroadenoma	0	Benigno
17	3,4	94,12	Adenoma Simples	0	Benigno
17	10,8	92,59	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
18	9,0	88,89	Adenoma Simples	0	Benigno
19	51,2	9,77	Carcinoma Complexo	1	Maligno
20	10,0	32,00	Carcinoma em Tumor Misto	3	Maligno
21	5,0	96,00	Carcinoma Micropapilar	1	Maligno
22	8,6	81,40	Carcinoma In situ	1	Maligno
23	12,2	54,10	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
23	16,8	67,86	Carcinoma em Tumor Misto		Maligno
24	9,6	27,08	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
25	10,0	72,00	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
26	10,6	54,72	Carcinoma Complexo	0	Maligno
27	7,0	45,71	Carcinoma Sólido	3	Maligno
28	19,8	38,38	Adenoma Simples	0	Benigno
29	18,0	44,44	Carcinoma em Tumor Misto	1	Maligno
30	19,4	55,67	Comedocarcinoma	3	Maligno
30	17,4	50,57	Comedocarcinoma	2	Maligno
30	14,4	73,61	Comedocarcinoma	3	Maligno
31	11,4	33,33	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
31	9,6	85,42	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
32	18,4	76,09	Carcinoma Anaplásico	3	Maligno
33	13,0	100,00	Adenoma Simples	0	Benigno
33	10,6	35,85	Carcinoma Sólido	2	Maligno
34	6,8	64,71	Carcinoma Complexo	1	Maligno
35	20,0	23,00	Carcinoma Complexo	1	Maligno
35	10,4	63,46	Carcinoma Simples Papilar	1	Maligno
36	11,6	25,86	Carcinoma Simples tubular	2	Maligno
36	14,4	43,06	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
37	11,2	78,57	Carcinoma em Tumor Misto	2	Maligno
38	30,8	36,36	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
38	12,4	27,42	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
39	12,4	83,87	Carcinoma In situ	-	Maligno
40	17,2	38,37	Carcinoma In situ	-	Maligno
40	9,0	62,22	Tumor Misto Benigno	0	Benigno
41	22,8	35,09	Carcinoma Cribriforme	3	Maligno
42	17,2	30,23	Carcinoma Complexo	1	Maligno
43	9,6	87,50	Adenoma Complexo	0	Benigno
44	17,8	25,84	Carcinoma Simples Papilar	2	Maligno
44	17,4	63,22	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
44	22,6	13,27	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
45	10,6	71,70	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
45	7,8	74,36	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
46	9,8	63,27	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
47	8,6	74,42	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno

48	6,8	73,53	Carcinoma Complexo	0	Maligno
48	7,8	56,41	Carcinoma Complexo	2	Maligno
49	11,6	60,34	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
49	10,8	64,81	Carcinoma Tubulopapilífero	2	Maligno
50	18,6	35,48	Carcinoma Complexo	3	Maligno
50	13,6	33,82	Carcinoma Complexo	3	Maligno
50	21,8	74,31	Carcinoma em Tumor Misto	3	Maligno
50	8,4	52,38	Carcinoma Simples tubular	1	Maligno
51	14,4	66,67	Tumor Misto Benigno	0	Benigno
52	18,0	68,89	Carcinoma Micropapilar	2	Maligno
53	8,4	76,19	Carcinoma Tubulopapilífero	1	Maligno
54	26,4	53,03	Adenoma Simples	0	Benigno

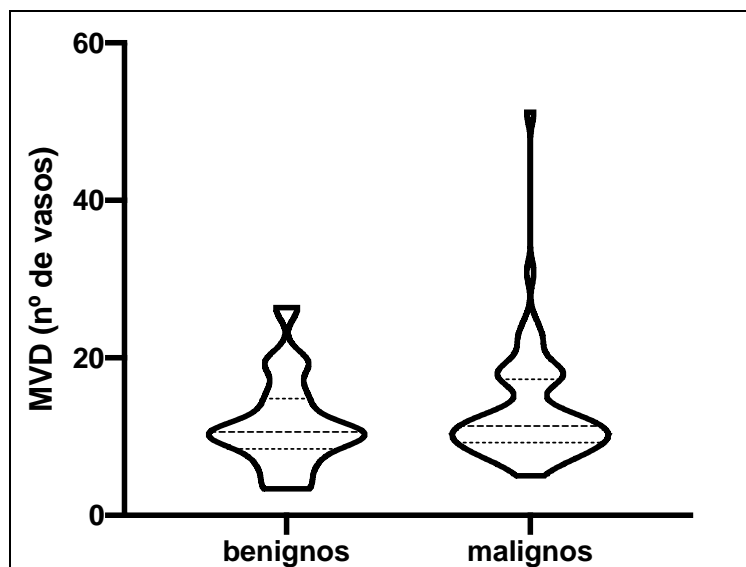
Fonte: Arquivo Pessoal

Os “*hot spots*” vasculares para a imunomarcação pelo vWF foram frequentemente observadas em localização peritumoral. O MVD médio foi de $13,1 \pm 4,81 \text{ mm}^2$ em 400X.

Antes das análises estatísticas para comparações dos parâmetros analisados, foram realizados os testes de normalidade de Anderson-Darling e Kolmogorov-Smirnov, que acusaram que as amostras não apresentavam distribuição normal. Em função disso, os dados foram submetidos a testes não-paramétricos (teste de Mann-Whitney, Spearman e Kruskal-Wallis).

As neoplasias analisadas foram separadas em dois grupos de acordo com sua classificação, denominados neoplasias benignas e neoplasias malignas, independentemente da morfologia. Quando comparadas a densidade microvascular média (MVD) e cobertura média por pericitos (MPI) entre os dois grupos não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) como mostrado nas figuras 4 e 5.

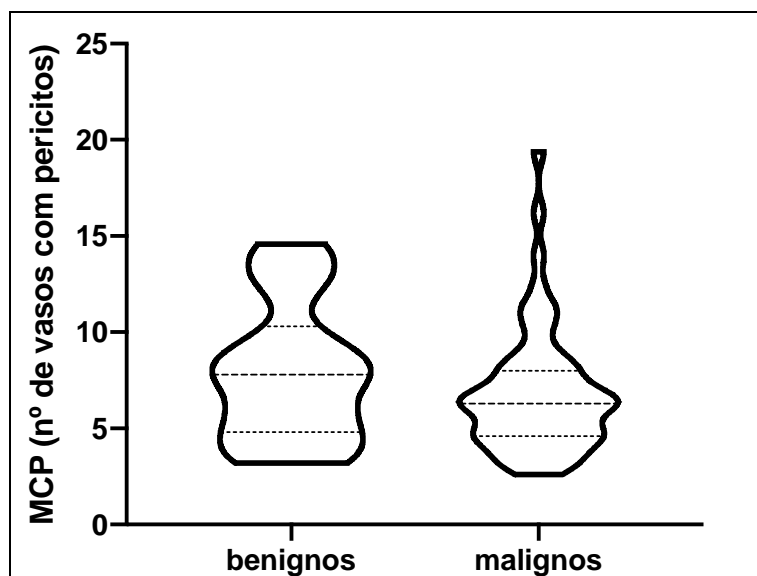
Figura 4: Densidade Microvascular Média (MVD) entre as neoplasias mamárias benignas e malignas.



Legenda: MVD em neoplasias mamárias caninas ($p=0,4109$); linha pontilhada espessa = mediana; linhas pontilhadas finas = quartis.

Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 5: Cobertura Média Vascular de Células Morfológicamente Indicativa de Pericitos (MCP) entre as neoplasias mamárias benignas e malignas caninas.

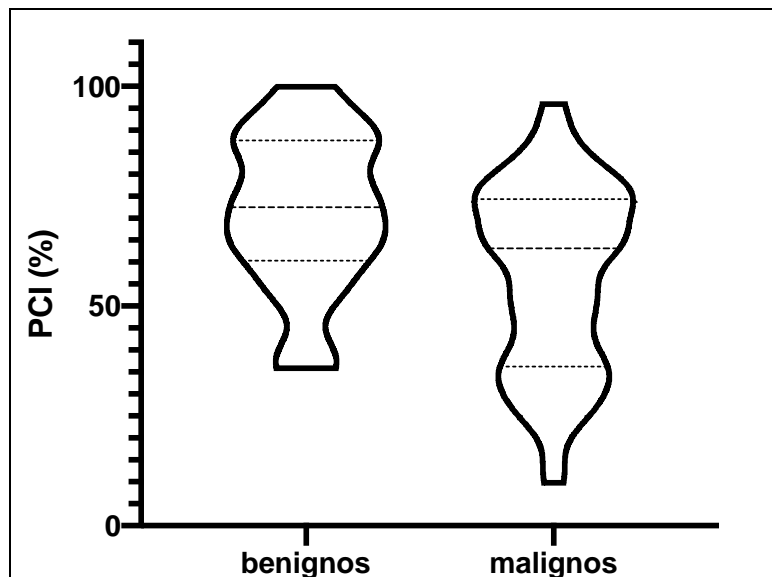


Legenda: MCP em neoplasias mamárias caninas ($p=0,2515$); linha pontilhada espessa = mediana; linhas pontilhadas finas = quartis.

Fonte: Arquivo Pessoal

Ao comparar o PCI entre ambos os grupos, obteve-se diferença estatística significativa ($p = 0,0135$), conforme observado na figura 6.

Figura 6: Índice de Cobertura Vascular de Células Morfologicamente Indicativa de Pericitos de Pericitos (PCI) entre neoplasias benignas e malignas.

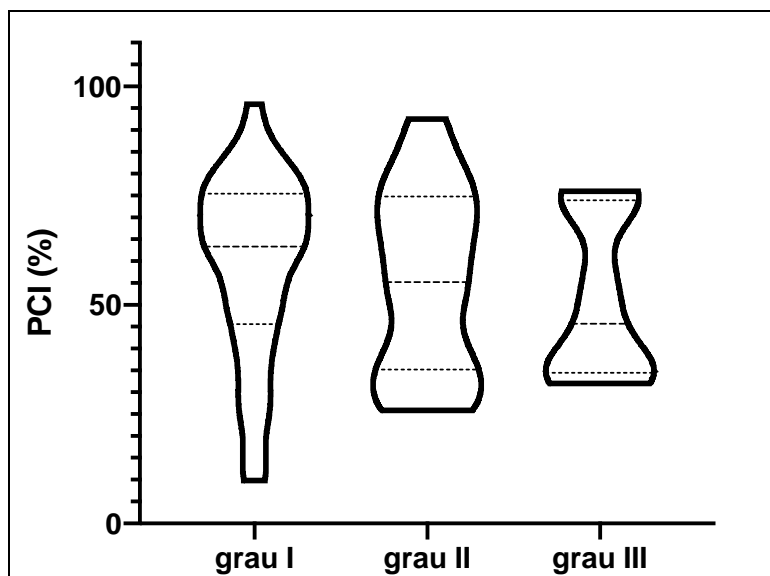


Legenda: %PCI em neoplasias mamárias caninas ($p=0,0135$); linha pontilhada espessa = mediana; linhas pontilhadas finas = quartis.

Fonte: Arquivo Pessoal

Quando comparados os PCIs dos diferentes graus histológicos das neoplasias mamárias malignas, foi considerada a lesão diagnosticada como maior grau para cada caso. Os resultados obtidos não foram significantes e são observados na figura 7.

Figura 7: Comparação do Índice de Cobertura Vascular de Células Morfologicamente Indicativa de Pericitos de Pericitos (PCI) entre diferentes graus histológicos entre neoplasias mamárias malignas.

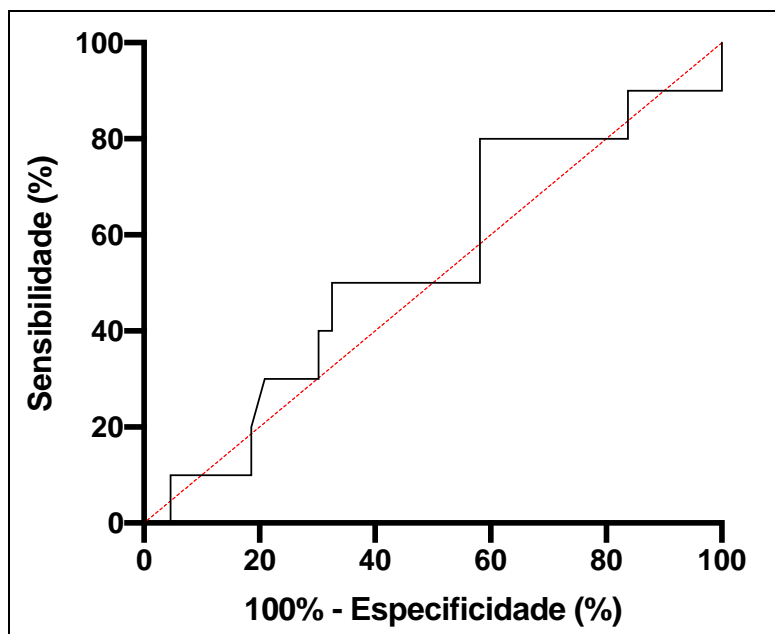


Legenda: PCI entre neoplasias mamárias caninas de acordo com o grau histológico ($p=0,5115$); linha pontilhada espessa = mediana; linhas pontilhadas finas = quartis.

Fonte: Arquivo Pessoal

Para a análise de sobrevida, foi construída uma curva ROC comparando o PCI de animais censurados (vivos ou óbitos não relacionados à doença) aos animais que morreram em função do tumor. A área abaixo da curva foi igual a 53,8% ($p = 0,7246$) (Figura 8).

Figura 8: Curva ROC correlacionando o PCI e a sobrevida dos animais do estudo.

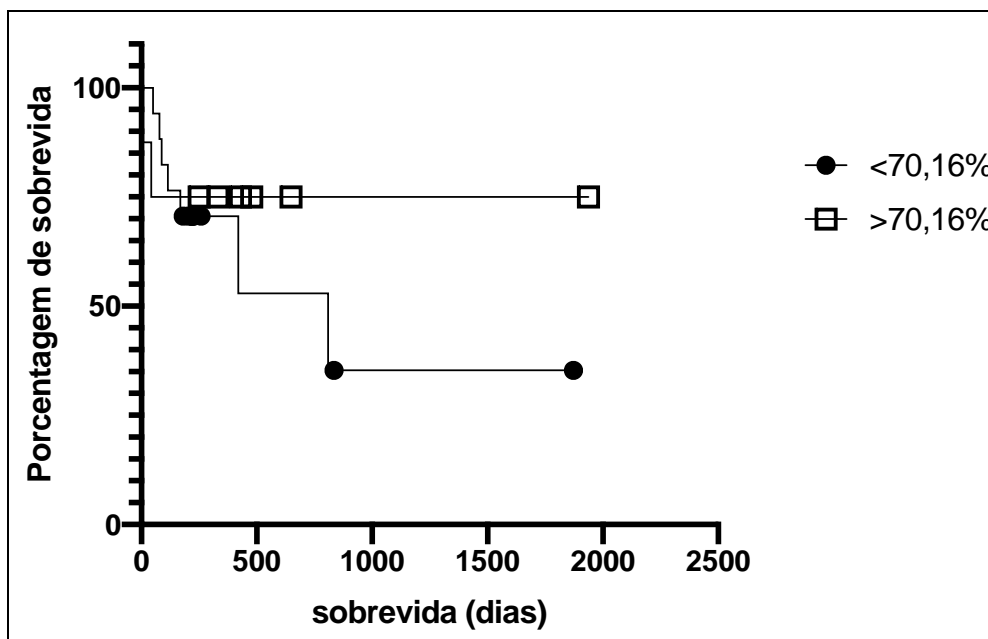


Legenda: Curva ROC comparando o PCI de animais censurados (vivos ou óbitos não relacionados à doença) aos animais que morreram em função do tumor. (área abaixo da curva = 0,538; $p = 0,7246$)

Fonte: Arquivo Pessoal

Embora a área abaixo da curva ROC, indicativa da capacidade de discriminação do teste diagnóstico, não tenha apresentado um valor alto, estabelecemos um valor de corte (*cutt-off*) de 70,16%, obtido pela maior soma entre sensibilidade e especificidade. Em seguida, os casos foram divididos em 2 grupos ($n=51$) e analisados pelo teste de Kaplan-Meier seguido de Mantel-Cox (*logrank*). Além disso, os casos censurados tiveram o limite de cut mínima definido em 180 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos com $PCI < 70,16\%$ e $PCI > 70,16\%$ (Figura 9).

Figura 9: Curva Kaplan-Meier em função do PCI, utilizando *cutt-off* de 70,16%.



Legenda: Kaplan-Meier, utilizando cut-off de 70,16% ($p=0,5615$, mediana de sobrevivida para o grupo PCI>70,16% = 810 dias).

Fonte: Arquivo Pessoal

7. DISCUSSÃO

O câncer mamário é uma doença heterogênea e influenciada por variáveis que ditam a sua progressão e desfecho como, por exemplo, a angiogênese. Em nosso estudo, buscamos caracterizar, pela primeira vez, a cobertura de pericitos nas neoplasias mamárias em cadelas, bem como avaliar o PCI como indicador prognóstico e, assim, trazer à discussão da oncologia veterinária, este tipo celular que já é alvo de pesquisas há pelo menos uma década.

Os resultados deste estudo indicam haver diferença nos PCIs entre neoplasias mamárias benignas e malignas. Por outro lado, o PCI não foi considerado como fator prognóstico quanto à sobrevivida pós-cirúrgica, nem foram observadas diferenças significantes entre PCIs de neoplasias malignas de diferentes graus de malignidade.

A cobertura microvascular por pericitos é correlacionada à maturidade vascular e diferentes neoplasias em humanos apresentam correlação negativa entre este parâmetro e a agressividade tumoral e sobrevivida (MĂRGĂRITESCU *et al.*, 2008; YONENAGA *et al.*, 2005). Surpreendentemente, não foi observada tal

interação entre o PCI e a sobrevida dos pacientes, resultado semelhante ao que observou Shrivastav *et al.*, (2016) em neoplasias mamárias em mulheres e diferente dos dados obtidos por Cooke *et al.*, (2012) para a mesma neoplasia. Uma possível explicação para não encontramos diferenças significantes seria baseada na característica morfológica da microvasculatura dos tumores mamários, que foi descrita como sendo composta por grande número de pericitos em humanos (BERGERS & SONG, 2005; EBERHARD, 2000). Tal fator pode ser limitante para utilizar o PCI como fator prognóstico, ao menos para este tipo tumoral e com o número amostral do presente estudo.

Com o intuito de confirmar o PCI como potencial fator prognóstico, acreditamos ser interessante realizar comparações deste índice em diferentes neoplasias caninas e, se possível, compará-las com resultados obtidos em seres humanos, tal qual realizado em nossa pesquisa.

Em condições de normalidade, a proporção entre células endoteliais e pericitos é bastante variável de acordo com o tecido e sua função (SHEPRO, 1993). Em neoplasias, observou-se variação entre 12% a 78% para o PCI (EBERHARD, 2000). Embora nosso estudo não apresente dados em tecidos normais, evidenciamos que neoplasias mamárias benignas de cadelas apresentam PCI significativamente maior quando comparadas às malignas (72,48% *versus* 63,13%). No microambiente tumoral, a maior taxa de proliferação celular aumenta a demanda por oxigênio, o que incita proliferação vascular (EMAMI NEJAD *et al.*, 2021 apud FOLKMAN, 1990 p. 4-7). A angiogênese, inicialmente, produziria vasos imaturos, ou seja, com baixa cobertura de pericitos (FERLAND-MCCOLLOUGH *et al.*, 2017). Ademais, o processo de proliferação celular é, sabidamente, mais intenso em neoplasias malignas quando comparado às benignas (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2020). Estes fatores em conjunto permitem sugerir que a presença de menor cobertura por pericitos observada neste estudo neoplasias malignas pode estar associado à maior taxa de angiogênese.

Esperávamos encontrar, também, relação inversa entre o PCI e o grau histológico das neoplasias malignas. Porém, semelhantemente ao observado em câncer endometrial, carcinoma de células escamosas oral (CCEO), carcinoma urotelial, e carcinoma mamário em humanos, não houve diferenças estatisticamente significantes (LIU *et al.*, 2008; O'KEEFFE *et al.*, 2008; SHRIVASTAV *et al.*, 2016; STEFANSSON; SALVESEN; AKSLEN, 2006). Carcinomas colorretais e renais

apresentam menor PCI conforme aumenta o grau de malignidade (KINOUCI *et al.*, 2003; YONENAGA *et al.*, 2005). Paradoxalmente, Kinouchi *et al.* (2003) observaram correlação positiva entre o grau histológico e o PCI em neoplasias renais.

Raica *et al.* (2021) descreveram três diferentes subtipos de vasculatura intermediária em carcinoma renal, classificando-os de acordo com a cobertura de pericitos. Concluíram que esta distribuição e a proporção entre vasos sanguíneos maduros e imaturos são dependentes do tipo histológico. Tais achados permitem postular que o PCI seja impactado diretamente pelo tipo de vasculatura predominante nas diferentes neoplasias e seus graus.

A angiogênese tumoral, mensurada pela MVD, têm sido objeto de estudo há anos para neoplasias mamárias em mulheres e animais. Na maioria dos estudos, observa-se correlação negativa entre o MVD e a sobrevida, mesmo utilizando diferentes anticorpos para marcação vascular, como o CD31 (DOS ANJOS *et al.*, 2019; FERRARI *et al.*, 2019; LAVALLE *et al.*, 2010; KRISHNAPRIYA *et al.*, 2019; SAKALAUŠKAITĖ *et al.*, 2022; SLEECKX *et al.*, 2013), o CD34 (WEIDNER *et al.*, 1991) e o vWF (GRAHAM & MYERS, 1999). Entretanto, não observamos diferenças de MVD médio entre as neoplasias mamárias benignas e malignas.

BOSTWICK *et al.* (2000) e NICO *et al.*, (2008) indicam que o tipo de anticorpo utilizado para marcação vascular (vWF, CD31 ou CD34), bem como o método de contagem, são fatores que podem interferir no resultado do MVD, além do tipo de neoplasia utilizada na amostragem.

Os diferentes anticorpos marcadores pan-vasculares apresentam variações importantes na intensidade, na porcentagem de vasos sanguíneos marcados e até mesmo na marcação errática de vasos linfáticos, sendo um importante ponto de diferenciação entre este estudo e outros que aferiram o MVD de neoplasias mamárias caninas. Martin *et al.* (1997), ao compararem os três diferentes marcadores endoteliais mais comuns, concluíram que o vWF apresentou uma porcentagem de marcação vascular menor quando comparado ao CD31 e o CD34 e também uma menor capacidade de marcação de células endoteliais isoladas. Apontamento semelhante foi feito por Benazzi *et al.* (2014) que comunicaram que estudos de angiogênese em carcinoma espinocelular canino apresentaram resultados antagônicos, relacionando esta disparidade à diferença entre os marcadores endoteliais escolhidos. Porém, optamos pelo anticorpo anti-vWF devido à sua marcação mais forte quando comparada ao CD31, necessária para melhor

acuidade visual da dupla marcação, muitas vezes sobreposta, do endotélio vascular e pericito.

Outro fator que pode levar a variações na contagem são os diferentes métodos existentes para este fim. As principais metodologias encontradas na literatura são o método de Chalkley (1943) que consiste em contabilizar, por gráticula cuja área compatível de 0,196 mm²; o de Weidner & Semple (1991) que realiza a contagem microvascular utilizando áreas diferentes de "hot spots" (objetiva de 20x - 0,738 mm² - e 40X - 0,1885 mm²); e o de Martin *et al.*, (1997), no qual realiza-se a contagem microvascular em 10 campos à Objetiva de 20x após localização do *hot spot*.

Também deve ser levada em consideração a localização da microvasculatura a ser abordada. Há estudos sobre a angiogênese tumoral em medicina veterinária que realizaram a contagem da neovasculatura apenas na localização intratumoral (GRAHAM & MYERS, 1999; GRIFFEY *et al.*, 1998). Porém, ainda não há consenso sobre a localização ideal para seleção dos "hot spots". Estudo sobre angiogênese e linfangiogênese realizado em 2013 por Sleenckx mostrou não haver diferença estatística entre as densidades vasculares das áreas intratumorais e peritumorais, o que permitiu embasar a nossa escolha para contagem do MVD pela área peritumoral. Apesar de alicerçar nossa escolha sobre a área na qual os vasos seriam contabilizados, cabe ressaltar que o mesmo estudo mostrou haver diferença da densidade microvascular entre as neoplasias benignas e malignas e mamas normais, a depender da localização observada (intratumoral x peritumoral), sendo mais abundantes na localização intratumoral. Isto pode explicar porque não observamos diferença estatística no MVD entre as neoplasias benignas e malignas no nosso estudo.

Para contagem e avaliação do PCI optamos por seguir o método de Yonenaga *et al.* (2005) e observação à objetiva de 40x. Esta escolha ocorreu devido à facilidade de execução do método quando comparado com outros descritos para a obtenção do PCI e pela necessidade de observar os pericitos contiguamente aos vasos sanguíneos, factível apenas em grande aumento.

As neoplasias malignas corresponderam a 76% dos casos, porcentagem semelhante à encontrada por Oliveira Filho *et al.* (2010), e inferior aos resultados de Rodríguez *et al.*, (2022) que observou que 90% das neoplasias em seu estudo eram malignas e de Nunes *et al.*, (2018) cuja porcentagem de câncer mamário foi de 85%.

Por outro lado, nossos resultados mostram porcentagem superior aos obtidos por Salas *et al.*, (2015b), cujo valor foi ao redor de 60%. Acredita-se que a alta porcentagem de diagnósticos malignos possa estar relacionada ao grande hiato de tempo decorrido entre o aparecimento e o diagnóstico das neoplasias, pois é sabido que o tempo prolongado permite a progressão de neoplasias mamárias benignas em malignas (FERREIRA *et al.*, 2009).

Em relação à localização das tumorações, as mamas abdominais caudais e inguinais são as mais afetadas por neoplasias mamárias. Tal relação parece ser explicada pela maior taxa de exposição hormonal a que são submetidas, devido principalmente à maior quantidade de parênquima existentes nestas mamas (CASSALI *et al.*, 2014; SORENMO *et al.*, 2009), resultados também encontrados no nosso estudo.

Embora esta investigação tenha sido bem sucedida em caracterizar o PCI em neoplasias mamárias de cadelas, acreditamos que será necessária a realização de novas pesquisas sobre esta célula para dirimir algumas dúvidas que nossa pesquisa não foi capaz de responder.

Estudos de neoplasias mamárias em humanos buscaram relacionar o tamanho tumoral, o PCI e metástases (SHRIVASTAV *et al.*, 2016), o que não conseguimos neste estudo por ausência deste tipo de dado nas informações disponíveis em prontuários. Outro fator importante e que não foi desenvolvido em nossa pesquisa é a mensuração do MVD e PCI em mamas não neoplásicas de cadelas e a observação se há mudanças (aumento/diminuição) do número de pericitos entre o tecido normal e os dados das neoplasias obtidos aqui.

Durante a obtenção das amostras, tivemos uma limitação quanto à variedade de tipos histológicos tumorais, bem como neoplasias menos diferenciadas (grau III). O número de neoplasias malignas correspondeu a 60 amostras e, dividindo-os por grau histológico, as porcentagens foram de 53% (grau I), 32% (grau II) e 15% (grau III). Estes dados corroboraram, em parte, um estudo epidemiológico chinês para neoplasias mamárias caninas publicado por Zheng *et al.*, (2022) cujas porcentagens para os diferentes graus foram de 41%, 32% e 23% respectivamente. Ao avaliarmos os dados dos dois estudos, notamos que há mais neoplasias de baixo grau e menos neoplasias de alto grau em ambos. Entretanto, nosso número amostral é sensivelmente menor (78 casos *versus* 504 casos).

Embora o tipo histológico seja um fator prognóstico independente para as

neoplasias mamárias e que há diferença sobrevida entre as diferentes neoplasias (RASOTTO *et al.*, 2017) nosso estudo não correlacionou estes subtipos ao PCI a fim de avaliar uma possível variabilidade intra-tumoral. Tal fato se deve à pouca variabilidade entre os tipos tumorais e ao número diminuto das amostras estudadas na nossa investigação.

Para confirmar nossos achados e realizar novos estudos, sugerimos realização de estudos complementares com um número maior de amostras.

Em outros estudos com tumores mamários e componentes do microambiente tumoral, o acompanhamento pós-cirúrgico variou entre 12 e 80 meses (CANADAS *et al.*, 2019; GARCIA *et al.*, 2021; NUNES *et al.*, 2018, 2019). Esta metodologia difere do tempo de acompanhamento clínico de nosso estudo, seis meses, permitindo postular que, em caso de acompanhamentos por mais tempo, poderíamos encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os PCIs das neoplasias malignas ou entre os grupos histológicos. Tal acompanhamento foi dificultado devido à ausência de dados clínicos nos registros hospitalares dos animais analisados, mostrando a importância da obtenção dos dados contínuos e completos pelos serviços de rotina diagnóstica e atendimento clínico-cirúrgico, principalmente nos hospitais escola.

O interesse sobre a compreensão da interação entre pericitos, o microambiente tumoral e a angiogênese tem crescido exponencialmente e isso é reflexo de diferentes estudos que apontam esta célula como um potencial ator na mecânica da resistência neoplásica a este tipo de terapia (MENG *et al.*, 2015; MONTEMAGNO; PAGÈS, 2020); Nossos resultados de caracterização deste tipo celular também tem a função de destacar os pericitos como relevantes na angiogênese tumoral na medicina veterinária e realçar a sua presença como possível fator limitante para terapias angiogênicas em medicina veterinária.

Este estudo representa a primeira tentativa de abordar os pericitos no MAT em medicina veterinária. Acreditamos que novos estudos acerca desta célula possam avaliar outras variáveis que não aferimos tais como a correlação da proliferação vascular e a cobertura por pericitos, se existe relação entre o índice de cobertura por pericitos e metástases nodais e/ou a distância e também realizar pesquisas em diferentes neoplasias.

8. CONCLUSÕES

- As neoplasias mamárias em cadelas apresentam cobertura por pericitos variável;
- Neoplasias mamárias malignas em cadelas apresentam menor PCI quando comparadas às benignas;
- Não observamos diferenças estatisticamente significantes para o PCI entre os diferentes graus de neoplasias malignas;
- O PCI não foi considerado um bom indicador prognóstico de sobrevida.

9. REFERÊNCIAS

- A. SCOTT, M.; SHEN, J.; LAM, K.; YEN, Y.-H.; SHRESTHA, S.; MRAVIC, M.; ASATRIAN, G.; G. CHUNG, C.; LUGASSY, C.; L. BARNHILL, R.; M. DRY, S.; PEAULT, B.; W. JAMES, A. **Review of Pericytes in Tumor Biology**. International Journal of Orthopaedics, v. 2, n. 3, p. 300–306, 2015. Disponível em: <<http://www.ghrnet.org/index.php/ijo/article/view/991>>.
- ABINPET. **ABINPET**. Disponível em: <http://abinpet.org.br/infos_gerais/>. Acesso em: 20 maio. 2022.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. **The tumor microenvironment**. Current Biology, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>>.
- ARMULIK, A.; GENOVÉ, G.; BETSHOLTZ, C. **Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises**. Developmental Cell 16 ago. 2011.
- BAGHBAN, R.; ROSHANGAR, L.; JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K.; EBRAHIMI-KALAN, A.; JAYMAND, M.; KOLAHIAN, S.; JAVAHERI, T.; ZARE, P. **Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance**. Cell Communication and Signaling, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2020.
- BENAZZI, C.; AL-DISSI, A.; CHAU, C. H.; FIGG, W. D.; SARLI, G.; OLIVEIRA, J. T. D.; GÄRTNER, F. **Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology**. The Scientific World Journal, 2014.
- BERGERS, GABRIELE; HANAHAN, D. **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy**. Nat Rev Cancer, v. 8, n. 8, p. 592–603, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.
- BERGERS, G.; SONG, S. **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance**. Neuro-Oncology, v. 7, n. 4, p. 452–464, 2005.
- BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z. M.; MESSI, M. L.; OLSON, J. D.; MINTZ, A.; DELBONO, O. **Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis**. American Journal of Physiology - Cell Physiology, v. 307, n. 1, 2014.
- BOSTWICK, D. G.; GRIGNON, D. J.; HAMMOND, M. E. H.; AMIN, M. B.; COHEN, M.; CRAWFORD, D.; GOSPADAROWICZ, M.; KAPLAN, R. S.; MILLER, D. S.; MONTIRONI, R.; PAJAK, T. F.; POLLACK, A.; SRIGLEY, J. R.; YARBRO, J. W.; SCHRAMM, J. **Prognostic factors in prostate cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999**. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, v. 124, n. 7, p. 995–1000, 2000.
- CANADAS, A.; FRANÇA, M.; PEREIRA, C.; VILAÇA, R.; VILHENA, H.; TINOCO, F.; SILVA, M. J.; RIBEIRO, J.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P.; DIAS-PEREIRA, P.;

SANTOS, M. **Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study**. *Veterinary Pathology*, v. 56, n. 2, p. 208–219, 2019.

CAO, Y.; ZHANG, Z. L.; ZHOU, M.; ELSON, P.; RINI, B.; AYDIN, H.; FEENSTRA, K.; TAN, M. H.; BERGHUIS, B.; TABBEY, R.; RESAU, J. H.; ZHOU, F. J.; TEH, B. T.; QIAN, C. N. **Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma**. *Cancer*, v. 119, n. 2, p. 313–334, 15 jan. 2013.

CASSALI, G. D. **Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

CASSALI, G. D.; JARK, P. C.; GAMBA, C.; DAMASCENO, K. A.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; HORTA, R. S.; FIRMO, B. F.; SUEIRO, F. A. R.; RODRIGUES, L. C. S.; NAKAGAKI, K. Y. R. **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.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; R SUEIRO, F. A.; O BESERRA, H. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; CECILIA LUVIZOTTO, M. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; R FERREIRA, A. M.; MTANAKA, N.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; L SALVADOR, R. C.; JARK, P. C.; R DELECRODI, J. E.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; CRISTINE S FERREIRA, K. R.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; F SILVA, F. B.; LEITE, J. S.; V MELLO, M. F.; DE LOURDES FERREIRA, M. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. **Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors-2013** *Braz J Vet Pathol*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.bjvp.org.br>.

CAVALCANTI MF. **Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos de cadelas cinomas mamários cadelas: Estadiamento TNM e sistema de Nottingham**. 2006. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CHALKLEY, H. W. **Method for the quantitative morphologic analysis of tissues**. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 4, n. 1, p. 47–53, 1943.

COOKE, V. G.; LEBLEU, V. S.; KESKIN, D.; KHAN, Z.; O'CONNELL, J. T.; TENG, Y.; DUNCAN, M. B.; XIE, L.; MAEDA, G.; VONG, S.; SUGIMOTO, H.; ROCHA, R. M.; DAMASCENA, A.; BRENTANI, R. R.; KALLURI, R. **Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway**. *Cancer Cell*, v. 21, n. 1, p. 66–81, 17 jan. 2012.

COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J. S.; LEITÃO, D.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F. C. **Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer**. *Journal of Clinical Pathology*, v. 55, n. 6, p. 429–434, 2002.

DE NARDI AB, R. S. R. N. F. S. Breast neoplasms. *In*: DALECK CR, DE N. A. **Oncology in Dogs and Cats**. 2nd. ed. São Paulo-Brazil: Roca, 2016.

DÍAZ-FLORES, L.; GUTIÉRREZ, R.; MADRID, J. F.; VARELA, H.; VALLADARES, F.;

ACOSTA, E.; MARTÍN-VASALLO, P.; DÍAZ-FLORES, J. **Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche.** *Histology and Histopathology*, v. 24, n. 7, p. 909–969, 2009.

DISSLER, M. E.; CASTELLANO, M. C.; PORTIANSKY, E. L.; BURNS, S.; IDIART, J. R. **Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time.** *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 15, n. 2, p. 450–461, 1 jun. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/vco.12189>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

DOS ANJOS, D. S.; VITAL, A. F.; LAINETTI, P. de F.; LEIS-FILHO, A. F.; DALMOLIN, F.; ELIAS, F.; CALAZANS, S. G.; FONSECA-ALVES, C. E. **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*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2019.

EBERHARD, A. **Erratum: Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies** *Cancer Research (March 1, 2000) (1388-1393)* *Cancer Research*. 2000.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I. O. **Assessment of histological grade.** 3rd. ed. London: Churchill Livingstone, 1998. p. 365-385 p.

EMAMI NEJAD, A.; NAJAFGHOLIAN, S.; ROSTAMI, A.; SISTANI, A.; SHOJAEIFAR, S.; ESPARVARINHA, M.; NEDAEINIA, R.; HAGHJOY JAVANMARD, S.; TAHERIAN, M.; AHMADLOU, M.; SALEHI, R.; SADEGHI, B.; MANIAN, M. **The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment.** *Cancer Cell International*, v. 21, n. 1, p. 1–26, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01719-5>>.

FERLAND-MCCOLLOUGH, D.; SLATER, S.; RICHARD, J.; RENI, C.; MANGIALARDI, G. **Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology** *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 1 mar. 2017.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. **Cancer statistics for the year 2020: An overview.** *International Journal of Cancer*, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERRARI, A. R. M.; FERRARI, H. F.; CARREIRA, V. S.; FRIGÉRIO, E. D.; LUVIZOTTO, M. C. R.; DE ANDRADE, A. L. **Microvessel density assessment in canine mammary carcinomas as a predictive factor for metronomic chemotherapy.** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 40, n. 5, p. 1849–1855, 2019.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; CAVALCANTI, M. F.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. **The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours.** *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, n. 4, p. 230–235, 2009.

FRANCO, M.; ROSWALL, P.; CORTEZ, E.; HANAHAN, D.; PIETRAS, K. **Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression.** *Blood*, v. 118, n. 10, p. 2906–2917, 2011.

GARCIA, A. P. V.; REIS, L. A.; NUNES, F. C.; LONGFORD, F. G. J.; FREY, J. G.; DE PAULA, A. M.; CASSALI, G. D. **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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85104-w>>.

GEE, M. S.; PROCOPIO, W. N.; MAKONNEN, S.; FELDMAN, M. D.; YEILDING, N. M.; LEE, W. M. F. **Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy**. American Journal of Pathology, v. 162, n. 1, p. 183–193, 2003.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. **Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours**. Veterinary Record, v. 146, n. 14, p. 403–406, 2000.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. **Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis**. Cell and Tissue Research, v. 314, n. 1, p. 15–23, 2003.

GERHARDT, H.; SEMB, H. **Pericytes: Gatekeepers in tumour cell metastasis?** Journal of Molecular Medicine fev. 2008.

GOEL, S.; GUPTA, N.; WALCOTT, B. P.; SNUDERL, M.; KESLER, C. T.; KIRKPATRICK, N. D.; HEISHI, T.; HUANG, Y.; MARTIN, J. D.; AGER, E.; SAMUEL, R.; WANG, S.; YAZBEK, J.; VAKOC, B. J.; PETERSON, R. T.; PADERA, T. P.; DUDA, D. G.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. **Effects of vascular-endothelial protein tyrosine phosphatase inhibition on breast cancer vasculature and metastatic progression**. Journal of the National Cancer Institute, v. 105, n. 16, p. 1188–1201, 2013.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. **Classification and grading of canine mammary tumors**. Veterinary Pathology, v. 48, n. 1, p. 117–131, jan. 2011.

GRIFFEY, S. M.; VERSTRAETE, F. J.; KRAEGEL, S. A.; LUCROY, M. D.; MADEWELL, B. R. **Computer-assisted image analysis of intratumoral vessel density in mammary tumors from dogs**. American journal of veterinary research, v. 59, n. 10, p. 1238–42, out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781454>>.

HE, L.; WANG, Q.; ZHAO, X. **Microvessel density as a prognostic factor in ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis**. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 16, n. 3, p. 869–874, 2015.

HOSAKA, K.; YANG, Y.; SEKI, T.; FISCHER, C.; DUBEY, O.; FREDLUND, E.; HARTMAN, J.; RELIGA, P.; MORIKAWA, H.; ISHII, Y.; SASAHARA, M.; LARSSON, O.; COSSU, G.; CAO, R.; LIM, S.; CAO, Y. **Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 113, n. 38, p. E5618–E5627, 20 set. 2016.

HUMPHREY, L. L.; HELFAND, M.; CHAN, B. K. S.; WOOLF, S. H. **Breast Cancer Screening: A Summary of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force** Ann Intern Med. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.annals.org>.

JAHANBAN-ESFAHLAN, R.; SEIDI, K.; ZARGHAMI, N. **Tumor vascular infarction: prospects and challenges**. International Journal of Hematology, v. 105, n. 3, p. 244–256, 2017.

JIANG, C.; HUANG, Y. H.; LU, J. Bin; YANG, Y. Z.; RAO, H. L.; ZHANG, B.; HE, W. Z.; XIA, L. P. Perivascular cell coverage of intratumoral vasculature is a predictor for bevacizumab efficacy in metastatic colorectal cancer. **Cancer Management and**

Research, v. 10, p. 3589–3597, 2018.

JIANG, X.; WANG, J.; DENG, X.; XIONG, F.; ZHANG, S.; GONG, Z.; LI, X.; CAO, K.; DENG, H.; HE, Y.; LIAO, Q.; XIANG, B.; ZHOU, M.; GUO, C.; ZENG, Z.; LI, G.; LI, X.; XIONG, W. **The role of microenvironment in tumor angiogenesis**. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 39, n. 1, p. 1–19, 2020.

JOANNE C. GRAHAM AND RONALD K. MYERS. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 416–418, 1999.

KIM, J. Pericytes in Breast Cancer. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. p. 93–107.

KIM, J.; DE SAMPAIO, P. C.; LUNDY, D. M.; PENG, Q.; EVANS, K. W.; SUGIMOTO, H.; GAGEA, M.; KIENAST, Y.; DO AMARAL, N. S.; ROCHA, R. M.; EIKESDAL, H. P.; LØNNING, P. E.; MERIC-BERNSTAM, F.; LEBLEU, V. S. **Heterogeneous perivascular cell coverage affects breast cancer metastasis and response to chemotherapy**. *JCI Insight*, v. 1, n. 21, 2016.

KINOUCI, T.; MANO, M.; MATSUOKA, I.; KODAMA, S.; AOKI, T.; OKAMOTO, M.; YAMAMURA, H.; USAMI, M.; TAKAHASHI, K. **Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma**. *Urology*, v. 62, n. 4, p. 765–770, 2003.

KRABY, M. R.; OPDAHL, S.; AKSLEN, L. A.; BOFIN, A. M. **Quantifying tumour vascularity in non-luminal breast cancers**. *Journal of Clinical Pathology*, v. 70, n. 9, p. 766–774, 2017. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/>>.

KRISHNAPRIYA, S.; MALIPATIL, B.; SUREKHA, S.; SUNDERSINGH, S.; SRIDEVI, V.; ANANTHI, B.; SELVALUXMY, G.; GANESAN, T. S. **Microvessel density (MVD) in locally advanced breast cancer**. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 20, n. 5, p. 1537–1545, 2019.

KUMAR, V., ABBAS, A. AND ASTER, J. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Diseases**. 10TH. ed. [s.l.] Amsterdam, 2020.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; FERREIRA, M. A. N. D.; CASSALI, G. D. **Mastócitos e angiogênese nos tumores mamários caninos**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n. 6, p. 1348–1351, 2010.

LI, T.; KANG, G.; WANG, T.; HUANG, H. **Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review)**. *Oncology Letters*, v. 16, n. 1, p. 687–702, 2018.

LI, Z.; NING, F.; WANG, C.; YU, H.; MA, Q.; SUN, Y. **Normalization of the tumor microvasculature based on targeting and modulation of the tumor microenvironment Nanoscale**. *Royal Society of Chemistry*, 7 nov. 2021.

LIU, Q.; YANG, Y.; FAN, X. **Microvascular pericytes in brain-associated vascular disease**. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 121, n. September 2019, p. 109633, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109633>>.

LIU, S. Y.; CHANG, L. C.; PAN, L. F.; HUNG, Y. J.; LEE, C. H.; SHIEH, Y. S. **Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma**. *Oral Oncology*, v. 44, n. 3, p. 277–285, 2008.

MĂRGĂRITESCU, C.; SIMIONESCU, C.; PIRICI, D.; MOGOANTĂ, L.; CIUREA, R.;

- STEPAN, A. **Immunohistochemical characterization of tumoral vessels in oral squamous cell carcinoma**. Romanian Journal of Morphology and Embryology, v. 49, n. 4, p. 447–458, 2008.
- MARTIN, L.; GREEN, B.; RENSHAW, C.; LOWE, D.; RUDLAND, P.; LEINSTER, S. J.; WINSTANLEY, J. **Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer**. British Journal of Cancer, v. 76, n. 8, p. 1046–1054, 1997.
- MATHIISEN, T. M.; LEHRE, K. P.; DANBOLT, N. C.; OTTERSEN, O. P. **The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction**. Glia, v. 58, n. 9, p. 1094–1103, 2010.
- MENG, M. Bin; ZAORSKY, N. G.; DENG, L.; WANG, H. H.; CHAO, J.; ZHAO, L. J.; YUAN, Z. Y.; PING, W. **Pericytes: A double-edged sword in cancer therapy** Future Oncology. Future Medicine Ltd., 1 jan. 2015.
- MONTEMAGNO, C.; PAGÈS, G. **Resistance to Anti-angiogenic Therapies: A Mechanism Depending on the Time of Exposure to the Drugs**. Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 8, n. July, p. 1–21, 2020.
- MORIKAWA, S.; BALUK, P.; KAIDOH, T.; HASKELL, A.; JAIN, R. K.; MCDONALD, D. M. **Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors**. American Journal of Pathology, v. 160, n. 3, p. 985–1000, 2002..
- NATARAJAN, V.; HA, S.; DELGADO, A.; JACOBSON, R.; ALHALHOOLY, L.; CHOI, Y.; KIM, J. **Acquired α SMA Expression in Pericytes Coincides with Aberrant Vascular Structure and Function in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma**. Cancers, v. 14, n. 10, 2022.
- NICO, B.; BENAGIANO, V.; MANGIERI, D.; MARUOTTI, N.; VACCA, A.; RIBATTI, D. **Evaluation of microvascular density in tumors: Pro and contra**. Histology and Histopathology, v. 23, n. 5, p. 601–607, 2008.
- NOEL WEIDNER, JOSEPH P. SEMPLE, W. R. W. and J. F. **Tumor Angiogenesis and Metastasis - Correlation in Invasive Breast Carcinoma**. The New England Journal of Medicine, v. 324, n. 1, p. 1–7, 1991.
- NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. **Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.
- NUNES, F. C.; DAMASCENO, K. A.; DE CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. **Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival**. Veterinary and Animal Science, v. 7, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.003>>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- O'KEEFFE, M. B.; DEVLIN, A. H.; BURNS, A. J.; GARDINER, T. A.; LOGAN, I. D.; HIRST, D. G.; MCKEOWN, S. R. **Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: Association with clinical outcomes**. Oncology Research, v. 17, n. 3, p. 93–101, 2008.
- OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. **Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

OWEN, L. **TNM Classification of tumours in domestic animals**. World Health Organisation, p. 1–52, 1980. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html>>.

PEÑA, L.; DE ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉREZ-ALENZA, M. D. **Prognostic Value of Histological Grading in Noninflammatory Canine Mammary Carcinomas in a Prospective Study With Two-Year Follow-Up: Relationship With Clinical and Histological Characteristics**. *Veterinary Pathology*, v. 50, n. 1, p. 94–105, jan. 2013.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; FERICIAN, O. C.; FERICIAN, A. M. **Tumour-associated Angiogenesis and Intermediate Blood Vessels in Renal Cell Carcinoma**. *Cancer Diagnosis & Prognosis*, v. 1, n. 3, p. 231–234, 2021.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. **Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases**. , v. 54, n. 4, p. 571–578, 2017.

RIBEIRO, A. L.; OKAMOTO, O. K. **Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment** *Stem Cells International*, 2015^a.

RIBEIRO, A. L.; OKAMOTO, O. K. **Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment** *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation, 2015b.

RODRÍGUEZ, J.; SANTANA, Á.; HERRÁEZ, P.; KILLICK, D. R.; DE LOS MONTEROS, A. E. **Epidemiology of canine mammary tumours on the Canary Archipelago in Spain**. *BMC Veterinary Research*, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03363-9>>.

SAKALAUSKAITĖ, S.; RIŠKEVIČIENĖ, V.; ŠENGAUT, J.; JUODŽIUKYNIENĖ, N. **Association of mast cell density, microvascular density and endothelial area with clinicopathological parameters and prognosis in canine mammary gland carcinomas**. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 64, n. 1, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13028-022-00633-2>>.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. **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, 18 maio 2015.

SENHORELLO, I. L. S.; TERRA, E. M.; SUEIRO, F. A. R.; FIRMO, B. F.; ANAI, L. A.; GOLONI, C.; CANAVARI, I. C.; AMPUERO, R. A. N.; PEREIRA, R. S.; TINUCCI-COSTA, M. **Clinical value of carcinoembryonic antigen in mammary neoplasms of bitches**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 18, n. 3, p. 315–323, 1 set. 2020.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARAEI, H.; KHADIVAR, F. **Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohystopathological study with environmental factors influencing public health and medicine**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cancerci.com/content/13/1/79>>.

SHEPRO, D.; MOREL, N. M. L. **Pericyte physiology**. *The FASEB Journal*, v. 7, n. 11, p. 1031–1038, 1993.

SHRIVASTAV, S.; BAL, A.; SINGH, G.; JOSHI, K. **Tumor Angiogenesis in Breast Cancer: Pericytes and Maturation Does Not Correlate with Lymph Node**

Metastasis and Molecular Subtypes. *Clinical Breast Cancer*, v. 16, n. 2, p. 131–138, 1 abr. 2016.

SLEECKX, N. **Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Canine Mammary Tumours.** 2013.

SLEECKX, N.; VAN BRANTEGEM, L.; FRANSEN, E.; VAN DEN EYNDEN, G.; CASTELEYN, C.; VELDHIJS KROEZE, E.; VAN GINNEKEN, C. **Evaluation of Immunohistochemical Markers of Lymphatic and Blood Vessels in Canine Mammary Tumours.** *Journal of Comparative Pathology*, 2013.

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFER, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDAHL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. **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.

SOUZA, F. R.; RAYMUNDO, D. L.; ALBUQUERQUE, A. S.; SIMÕES, L. M. S.; CASSALI, G. D. **Canine Mammary Neoplasms - Evaluation of Tumor Microenvironment.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 50, n. January, p. 1–8, 2022.

WANG, J.; ZOHAR, R.; MCCULLOCH, C. A. **Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction.** *Experimental Cell Research*, v. 312, n. 3, p. 205–214, 2006.

WEBSTER, J. D.; DENNIS, M. M.; DERVISIS, N.; HELLER, J.; BACON, N. J.; BERGMAN, P. J.; BIENZLE, D.; CASSALI, G.; CASTAGNARO, M.; CULLEN, J.; ESPLIN, D. G.; PEÑA, L.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HAHN, K. A.; HENRY, C. J.; HELLMÉN, E.; KAMSTOCK, D.; KIRPENSTEIJN, J.; KITCHELL, B. E.; AMORIM, R. L.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MCENTEE, M.; MCGILL, L. D.; MCKNIGHT, C. A.; MCMANUS, P. M.; MOORE, A. S.; MOORE, P. F.; MOROFF, S. D.; NAKAYAMA, H.; NORTHRUP, N. C.; SARLI, G.; SCASE, T.; SORENMO, K.; SCHULMAN, F. Y.; SHOIEB, A. M.; SMEDLEY, R. C.; SPANGLER, W. L.; TESKE, E.; THAMM, D. H.; VALLI, V. E.; VERNAU, W.; VON EULER, H.; WITHROW, S. J.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; KIUPEL, M. **Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology.** *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 7–18, 2011.

YAMAZAKI, T.; MUKOUYAMA, Y. S. **Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes.** *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A., 27 jun. 2018.

YAN, G.; ZHOU, X.-Y.; CAI, S.-J.; ZHANG, G.-H.; PENG, J.-J.; DU, X.; SUBMISSIONS, O.; COM, W. W. **Lymphangiogenic and angiogenic microvessel density in human primary sporadic colorectal carcinoma** RAPID COMMUNICATION. *World J Gastroenterol*, v. 14, n. 1, p. 101–107, 2008. Disponível em: <www.wjgnet.com>.

YONENAGA, Y.; MORI, A.; ONODERA, H.; YASUDA, S.; OE, H.; FUJIMOTO, A.; TACHIBANA, T.; IMAMURA, M. **Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients.** *Oncology*, v. 69, n. 2, p. 159–166, set. 2005.

ZHAO, H.; CHAPPELL, J. C. **Microvascular bioengineering: A focus on pericytes.** *Journal of Biological Engineering*, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

ZHENG, H. H.; DU, C. T.; YU, C.; ZHANG, Y. Z.; HUANG, R. L.; TANG, X. Y.; XIE, G. H. **Epidemiological Investigation of Canine Mammary Tumors in Mainland China Between 2017 and 2021**. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, n. June, p. 1–10, 2022.