10ª Jornada Científica e Tecnológica
7º Simpósio da Pós-Graduação
INSTITUTO FEDERAL Sul de Minas Gerais
ISSN 2319-0124

ANÁLISE COMPARATIVA DO COLÁGENO ENTREMEADO AO TUMOR EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Ana Letícia D. A. da SILVA[1]; Larissa F. MAGALHÃES[2]; Ricardo P. NOCITI[3]; José Luiz de SOUZA[4]; Geórgia M. MAGALHÃES[5]

RESUMO

As neoplasias mamárias apresentam alta incidência de malignidade e seu desenvolvimento é multifatorial. Objetivou-se verificar se o estroma poderia ser avaliado como um novo biomarcador de agressividade celular por meio de técnicas histoquímicas. Foram selecionadas 27 amostras de diferentes tipos de tumores de cadelas registradas no HV da UNIFRAN. As lâminas foram classificadas segundo Cassali et al. (2014). Para a análise histoquímica, foram realizados novos cortes nos tecidos, coloração com Picrossirius Red e fotomicrografias em microscópio de luz polarizada integrado a um *software* de captura. Em seguida, as fotomicrografias digitais foram avaliadas no Image J® para quantificação do colágeno. Verificou-se aumento significativo da porcentagem de colágeno em neoplasias mamárias malignas metastáticas (NMMM) pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido de Chi-quadrado ($p<0,05$) em relação às neoplasias mamárias benignas (NMB) e às neoplasias mamárias malignas (NMM) grau III. Portanto, conclui-se que há uma correlação entre a quantidade de colágeno e a agressividade celular de neoplasias mamárias em cadelas.

Palavras-chave: Cadela; Fibrose; Glândula mamária; Metástase; Picrossirius.

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias espontâneas são as mais comuns em cadelas e mulheres (MELIN et al., 2016), sendo que cerca de 60 a 70% dos casos de neoplasias mamárias são malignas (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). A invasão e a metástase são características biológicas de tumores malignos e influenciam diretamente no prognóstico do câncer de mama, uma vez que a mortalidade desses pacientes é alta (KUMAR, et al. 2005).

As neoplasias malignas têm origem multifatorial, sendo advindas não só de anormalidades genéticas, mas também das interações das células neoplásicas com o estroma e células inflamatórias (WERBECK et al., 2014). Há alteração significativa da matriz extracelular nas neoplasias mamárias primárias, e sendo assim, essa modificação poderia servir como um novo biomarcador para o diagnóstico de câncer, com a finalidade de prever a metástase, estabelecer o prognóstico e tratamento adequado (PROVENZANO et al., 2008).

Há relatos na literatura de que o aumento na quantidade de colágeno no tecido mamário aumenta em três vezes as chances de desenvolvimento de tumor e proporciona a transformação

[1]Docente na Faculdade de Medicina (FACERES), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.
[2]Docente na Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, São Paulo, Brasil.
[3]Docente na Universidade de Araraquara (UNIARA), Araraquara, São Paulo, Brasil.
[4]Histotécnico da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, São Paulo, Brasil.
[5]Docente no Instituto Federal Sul de Minas – Muzambinho, Muzambinho, Minas Gerais, Brasil.

fenotípica das células neoplásicas, convertendo-as em células mais invasivas (PROVENZANO et al., 2008). O arranjo radial das fibras de colágeno também é um importante parâmetro visto que ele facilita a invasão dos tecidos adjacentes (PROVENZANO et al., 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou correlacionar a quantidade de colágeno com o grau de malignidade de tumores mamários caninos por meio de técnicas histoquímicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo obteve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFRAN pelo número de protocolo: 4512311016. Os tecidos mamários de cadelas acompanhadas no Hospital Veterinário da Universidade de Franca, de 2013 a 2016, com o diagnóstico de neoplasias mamárias benignas - NMB (7), neoplasias mamárias malignas - NMM grau III (6) e neoplasias mamárias malignas metastáticas - NMMM (14). Posteriormente, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina foram classificadas de acordo com Cassali et al. (2014).

Realizou-se novos cortes nos tecidos incluídos em parafina dos animais selecionados que foram seguidamente corados com Picrossirius Red (Kit Polímero Spring Bioscence Reveal Biotin-Free System – Roche®, Brasileira – Suíça) para análise histoquímica.

A seguir, todas as lâminas foram fotografadas em cinco campos aleatórios (objetiva de 20x) por meio de microscópio de luz polarizada (Leica Microscope® DMS 2900, Wetzlar – Alemanha) integrado a um *software* de captura (LAS 4.0). Em seguida, foi feita análise da fotomicrografia digital por meio do programa Image J® para determinação da porcentagem de colágeno, obtida pela média das porcentagens das cinco imagens.

A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico *Kruskal-Wallis* seguido de Chi-quadrado, em diferentes grupos (NMB vs. NMMM, NMMM vs. NMM grau III) utilizando um grau de significância de 5% ($p<0,05$), por meio do *GraphPad Prism v.5 Statistical Software*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A quantidade de colágeno observada nas NMMM (8,52±0,24) foram superiores ($p>0,01$) em relação as NMB (0,33±0,08, Figura 1A), assim como as NMMM (7,36±0,81) também foram superiores às NMM grau III (3,91±0,11, Figura 1B).

Diante dos resultados apresentados podemos constatar que a porcentagem de colágeno está diretamente relacionada à agressividade celular e à ocorrência de metástase em cadelas com neoplasias mamárias, visto que houve diferença entre a quantidade de colágeno em neoplasias metastáticas e neoplasias não metastáticas, além de neoplasias benignas e neoplasias metastáticas. Hasebe et al. (1996) também constataram maior agressividade dos carcinomas ductais invasivos

com fibrose em relação aos sem fibrose. Semelhantemente, Toledo et al. (2018) relataram relação positiva entre grau de malignidade e a quantidade de colágeno.

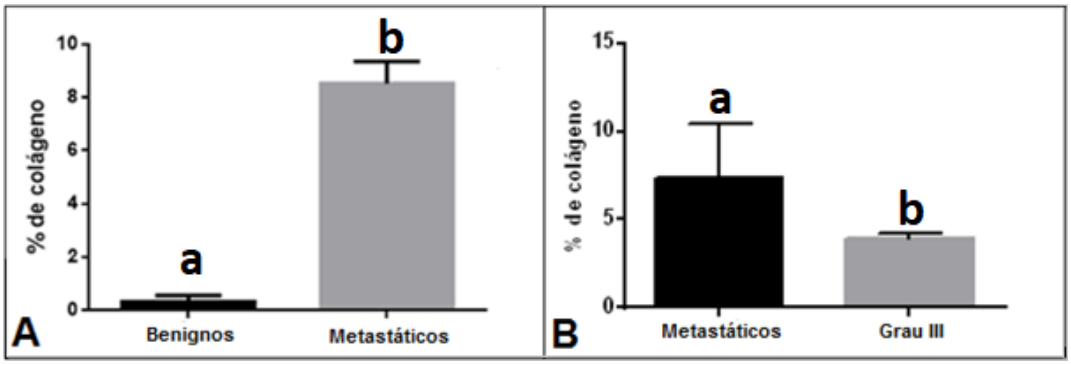

Figura 1. A) Comparação das quantidades de colágeno (em %) de NMB *vs.* NMMM; B) Comparação das quantidades de colágeno (em %) de NMMM *vs.* NMM grau III.

A quantidade de colágeno tipo I em carcinomas mamários invasivos é uma variável importante para a ocorrência de metástase, pois evidenciou-se maior acometimento de linfonodos em pacientes com maior densidade de fibras de colágeno tipo I (KAKKAD et al., 2012). O colágeno tipo I desencadeia uma reação enzimática que desestrutura a E-caderina, causando maior mobilidade das células neoplásicas e com isso maior invasividade e possibilidade de metástase (LI et al., 2010).

As técnicas imuno-histoquímicas utilizam vários anticorpos os quais foram sintetizados e testados para estabelecer o prognóstico de tumores. No entanto, grande parcela dos anticorpos desenvolvidos na atualidade identifica apenas antígenos humanos, não sendo aplicável a área de patologia veterinária. Desta forma, as técnicas histoquímicas realizadas diariamente em laboratórios de anatomia patológica são ótimas opções para prever a agressividade celular. Ademais, a histoquímica mostra-se uma técnica simples e mais acessível.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que há uma relação direta entre a quantidade de colágeno e a agressividade celular de metástase em neoplasias mamárias caninas. Além disso, as técnicas histoquímicas se mostraram uma ótima opção para quantificação de colágeno.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

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.; SUEIRO, F.A.R.; BESERRA, H.E.O.;

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.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, v.7, n.2, p.38-69, 2014.

HASEBE, T.; TSUDA, H.; HIRORASHI, S.; SHIMOSATO, Y.; IWAI, M.; IMOTO, S.; MUKAI, K. Fibrotic focus in invasive ductal carcinoma: an indicator or high tumor aggressiveness. **Japanese Journal of Cancer Research,** v. 87, n. 4, p. 385-394, 1996.

JOÃO, C.F.; TINUCCI-COSTA, M.; CARDILLI, D.J.; FARIA, J.L.M.; MAGALHÃES, G.M.; ALESSI, A.C. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. **Ciência Rural**, v.41, n.9, 2011.

KAKKAD, S.M.; SOLAIYAPPAN, M.; ARGANI, P.; SUKUMAR, S.; JACOBS, L.S.; LEIBFRITZ, D.; BHUJWALLA, Z.M.; GLUNDE, K. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **Journal of biomedicals optics**, v. 17, p. 116017, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Saunders Elsevier: Rio de Janeiro, 2005, cap. 7, p. 281-356.

LI, A.; ZHOU, T.; GUO, L.; SI, J. Collagen type I regulates ß-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. **Oncology reports**, v. 23, p. 1247-1255, 2010.

MELIN, M.; RIVERA, P.; ARENDT, M.; ELVERS, I.; MURÉN, E.; GUSTAFSON, U.; STARKEY, M.; BORGE, K.S.; LINGAAS, F.; HÄGGSTRÖM, J.; SAELLSTRÖM, S.; RÖNNBERG, H.; LINDBLAD-TOH, K. Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumors. **PLoS Genetics,** v.12, n.5, 2016.

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.

PROVENZANO, P.P.; ELICEIRI, K.W.; CAMPBELL J.M.; INMAN, D.R.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v.4, n.38, 2006.

PROVENZANO, P.P.; INMANI, D.R.; ELICEIRI, K.W.; KNITTEL, J.G.; YAN, L.; RUEDEN, C.T.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v.6, n.11, 2008.

TOLEDO, G.N.; FELICIANO M.G.R.; USCATEGUI R.A.R.; MAGALHÃES G.M.; MADRUGA G.M.; VICENTE W.R.R. Tissue fibrosis in its correlation with malignancy in canine mammary tumors. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. n. p. pendentes, 2018.

WERBECK J.L.; THUDI N.K.; MARTIN C.K.; PREMANANDAN C.; YU, L.; OSTROWKSI, M.C.; ROSOL, T.J. Tumor Microenvironment Regulates Metastasis and Metastasis Genes of Mouse MMTV-PymT Mammary Cancer Cells *In Vivo*. **Veterinary Pathology**, v.51, n.4, p.868-881, 2014.