

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

SUÉLLEN AMARO DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE NÚCLEOS CELULARES PARA
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS**

**UBERLÂNDIA
2022**

SUÉLLEN AMARO DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE NÚCLEOS CELULARES PARA
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Marcelo Emilio Beletti

Co-orientador (a): Alessandra Aparecida
Medeiros-Ronchi

UBERLÂNDIA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586c
2022 Silva, Suéllen Amaro da, 1986-
Características morfométricas de núcleos celulares para diagnóstico e prognóstico de carcinomas mamários em cadelas [recurso eletrônico] / Suéllen Amaro da Silva. - 2022.
65 p.
- Orientador: Marcelo Emilio Beletti.
Coorientadora: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.8003>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Citologia. I. Beletti, Marcelo Emilio, 1964-, (Orient.). II. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida, 1971-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas
Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 08/2022, do PPGBC				
Data:	30 de Novembro de 2022	Hora de início:	9:00	Hora de encerramento:	11:10
Matrícula do Discente:	12012BCE007				
Nome do Discente:	Suéllen Amaro da Silva				
Título do Trabalho:	Características morfométricas de núcleos celulares para diagnóstico e prognóstico de carcinomas mamários em cadelas				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia Celular Tumoral				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo do perfil molecular de tumores originários de epitélio de revestimento e glandular				

Reuniu-se na Sala 2B236, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: **Paulo Rogério de Faria** - UFU; **Humberto Eustáquio Coelho** – UNIUBE e **Marcelo Emílio Beletti** – UFU orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Marcelo Emílio Beletti**, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente **Suéllen Amaro da Silva** a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Rogerio de Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/11/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Eustáquio Coelho, Usuário Externo**, em 30/11/2022, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4097191** e o código CRC **DD8D1C29**.

Dedico este trabalho a minha filha, Laura, que chegou em meio a jornada acadêmica, e por muitas vezes, ficou à minha espera para que eu pudesse concluir minha pesquisa. Eu busco aqui, inspirações não só para realização de um sonho, mas também perspectivas para alcançar o melhor para sua vida!

AGRADECIMENTOS

Para realização desta pesquisa, enfrentei muitos desafios, uma jornada árdua e dois anos de muito esforço e dedicação, mas que me permitiu acreditar, superar e vencer inúmeros obstáculos. Por isso agradeço, primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria para eu entregar o melhor de mim.

Gratidão à família e todos que direta ou indiretamente me auxiliaram nos meus estudos, criando possibilidades para que eu pudesse desenvolver e apresentar uma pesquisa de qualidade para a comunidade acadêmica e à sociedade.

Agradeço ao meu orientador, pela orientação científica, paciência, compreensão e todo o apoio concedido durante este período, em especial em virtude da minha condição, enquanto gestante.

Igualmente grata pela co-orientação e o auxílio de toda a equipe da medicina veterinária, que me propiciaram oportunidade e conhecimento para trabalhar com a espécie canina.

“Um sonho que você deixa para trás, é parte do seu futuro que deixa de existir”
(Steve Jobs)

RESUMO

Para fins de classificação e prognóstico, o exame histopatológico é o método de escolha para os carcinomas mamários caninos. No entanto, nem sempre é claro e objetivo. Para aumentar a precisão, é possível utilizar marcadores moleculares ou uma análise computacional mais detalhada do núcleo da célula. O objetivo deste estudo foi identificar quais características nucleares são mais relevantes para determinar o prognóstico e diferenciar os principais tipos de carcinomas mamários caninos. Foram utilizados um total de 74 casos de oito tipos diferentes de carcinomas mamários em cadelas com evolução conhecida. Utilizando análise de imagens computadorizadas de lâminas coradas com hematoxilina/eosina, foram avaliadas diversas características relacionadas ao tamanho, forma, pleomorfismo e textura da cromatina do núcleo. Análises discriminantes canônicas foram realizadas para prognóstico e diagnóstico diferencial e as funções canônicas obtidas para prognóstico em um único tipo de tumor tiveram alta taxa de acerto. Em geral, as características relacionadas à forma do núcleo foram as mais relevantes para o prognóstico, seguidas pelas características de tamanho, pleomorfismo e textura da cromatina. Para o diagnóstico diferencial dos principais tipos de carcinomas mamários em cadelas, as características relacionadas à forma do núcleo são as mais relevantes, enquanto as relacionadas ao tamanho, pleomorfismo e textura da cromatina do núcleo possuem relevância similares.

Palavras-chave: Núcleo celular. Heterocromatina. Carcinoma mamário. Cadela. Prognóstico. Diagnóstico. Análise de imagem assistida por computador.

ABSTRACT

For classification and prognostic purposes, histopathological evaluation is the method of choice for canine mammary carcinomas. However, it is not always clear and objective. To increase accuracy, molecular markers or a more detailed computational analysis of the cell nucleus can be used. The aim of this study was to identify which nuclear features are most relevant in determining prognosis and differentiating the main types of canine mammary carcinomas. A total of 74 cases of eight different types of mammary carcinomas in female dogs with known evolution were used. Using computer image analysis of slides stained with hematoxylin/eosin, several features related to size, shape, pleomorphism, and chromatin texture of the nucleus were evaluated. Canonical discriminant analyses were performed for prognosis and differential diagnosis, and the canonical functions obtained for prognosis in a single tumor type had a high hit rate. In general, features related to nucleus shape were the most relevant for prognosis, followed by features of size, pleomorphism, and chromatin texture. For the differential diagnosis of the main types of mammary carcinomas in bitches, features related to nucleus shape are the most relevant, while those related to nucleus size, pleomorphism and chromatin texture have similar relevance.

Key terms: Cell nucleus. Heterochromatin. Mammary neoplasms. Bitches. Prognosis. Diagnosis. Computer-assisted image analysis.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação da segmentação de um núcleo extraído de tecido neoplásico.....	32
Figura 2	Erros e acertos de prognóstico, de todos os casos, após aplicação da função discriminante em relação ao ponto de corte.....	38
Figura 3	Distribuição de todos os casos de carcinoma misto com base no ponto de corte.....	41
Figura 4	Distribuição de todos os casos de carcinoma tubular com base no ponto de corte.....	44
Figura 5	Distribuição do carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma complexo em relação aos pontos de corte.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama.....	35
Tabela 2	Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama.....	36
Tabela 3	Estimativa de erros de predição de prognóstico conforme função discriminante para os casos independentemente do tipo de tumor de mama.....	38
Tabela 4	Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico carcinoma misto mamário.....	39
Tabela 5	Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico de carcinoma tipo misto.....	40
Tabela 6	Estimativa de erros de predição de prognóstico conforme função discriminante para os casos de carcinoma tipo misto.....	41
Tabela 7	Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico carcinoma tubular.....	42
Tabela 8	Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico de carcinoma tubular.....	43
Tabela 9	Estimativa de erros de predição de prognóstico conforme função discriminante para os casos de carcinoma tubular.....	43
Tabela 10	Coeficientes canônicos das duas funções discriminantes utilizadas para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.....	45
Tabela 11	Estrutura canônica da função discriminante 1 para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo	46
Tabela 12	Estrutura canônica da função discriminante 2 para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo	47
Tabela 13	Estimativa de erros de diferenciação de tipos de tumor utilizando as funções discriminantes para carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Área do núcleo
Alr	Alongamento do principal ROIs
Amr	Área média dos ROIs
C	Comprimento ou eixo maior do núcleo
Co	Carcinoma tipo complexo
CoAr	Coeficiente da área dos ROIs
$\text{CoAr}/(\text{CoPr})^2$	Razão entre coeficiente da área dos ROIs e coeficiente do perímetro dos ROIs elevado ao quadrado
CoPr	Coeficiente do perímetro dos ROIs
DMnr	Distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos ROIs
DPA	Desvio padrão da área do núcleo
DPAr	Desvio padrão da área dos ROIs
$\text{DPAr}/(\text{DPPr})^2$	Razão entre desvio padrão da área dos ROIs e desvio padrão do perímetro dos ROIs elevado ao quadrado
DPC	Desvio padrão do comprimento do núcleo
DPE	Desvio padrão da elipticidade do núcleo
DPFF	Desvio padrão do fator forma
DPL	Desvio padrão da largura do núcleo
DPL/C	Desvio padrão da razão entre largura e comprimento do núcleo
DPP	Desvio padrão do perímetro do núcleo
DPPr	Desvio padrão do perímetro dos Rois
DPSAP	Desvio padrão da simetria anteroposterior
E	Elipticidade do núcleo
ER	Receptor de estrógeno alfa
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano-2
H&E	Hematoxilina-eosina
FF	Fator forma
L	Largura ou eixo menor do núcleo
L/C	Razão entre largura e comprimento do núcleo
Mi	Carcinoma tipo misto

nr	Número dos ROIs
P	Perímetro do núcleo
Pmr	Perímetro médio dos ROIs
PR	Receptor de Progesterona
ROIs	Regiões de interesse
SAP	Simetria anteroposterior
SL	Simetria lateral
TNM	Tamanho do tumor - Estado dos linfonodos - Metástase à distância
Tu	Carcinoma tubular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Generalidades.....	17
2.2	Tumores mamários canino.....	19
2.2.1	Classificação dos Tumores Mamários Caninos.....	22
2.2.2	Métodos de diagnóstico laboratorial.....	23
2.2.3	Prognóstico dos tumores mamários em cães.....	24
2.3	Tumores mamários canino como modelo biológico para o câncer de mama humano.....	26
2.4	Análise de imagem aplicada ao câncer de mama.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Obtenção das amostras.....	31
3.2	Segmentação e processamento de imagens.....	31
3.3	Estatística.....	33
4	RESULTADOS.....	35
5	DISCUSSÃO.....	50
6	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS.....	61
	ANEXO A - Classificação histológica dos tumores mamários caninos segundo Goldschmidt (2011).....	61
	ANEXO B - Predição prognóstica conforme evolução dos casos analisados.....	63

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias mamárias representam a principal causa de mortalidade da espécie canina, em especial nas fêmeas. Estima-se que cerca de 30 (MISDORP, 2002) - 53,3% (MOE, 2001) são malignas e que a incidência anual seja de 198 casos a cada 100.000 cadelas (MISDORP, 2002). Semelhantemente, na espécie humana nota-se uma expressiva incidência de neoplasia mamárias em mulheres e os aspectos clínicos e patológicos são similares em ambas as espécies, bem como, fatores de risco relacionados à carcinogênese são bem parecidos, tais como a exposição à carcinógenos ambientais em comum, a obesidade e idade avançada (GRAY et al., 2020).

O cão demonstra grande semelhança anatômica, fisiológica, imunológica e genética à espécie humana do que outros modelos comumente utilizados. Essa similaridade entre espécie canina e humana permite o uso do cão como modelo biológico para estudo de neoplasias. Paralelamente, parâmetros utilizados na medicina humana são mais fáceis de serem aplicados na espécie canina (GRAY et al., 2020). E adicionalmente, uma sobrevida mais curta pode favorecer investigações pré-clínicas de novos medicamentos anticancerígenos na espécie canina (NGUYEN et al., 2017). No entanto, a reprodutibilidade de dados epidemiológicos pode ser prejudicada pois não há padrões internacionais de registros veterinários (GRUNTZIG et al., 2016).

Para fins de diagnósticos, o exame histopatológico é o método de escolha e a partir dele geralmente são realizados a classificação e o prognóstico de tumores mamários caninos (RASOTTO et al., 2017). A princípio, este método permite avaliar o risco de metástases regionais ou até mesmo à distância, cuja condição relaciona-se a um pior prognóstico e requer uma terapêutica específica para aumentar a sobrevida global dos cães acometidos (NUNES et al., 2018). O sistema de classificação e graduação histológico fundamenta-se em estabelecer critérios de malignidade, a saber: tipo de tumor, pleomorfismo celular e nuclear, índice de mitose, necrose, invasão linfática e peritumoral e metástase loco-regional (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Entretanto, a classificação histopatológica nem sempre apresenta um prognóstico claro, pois frequentemente um mesmo subtipo pode estar relacionado a diferentes comportamento e evolução. Neste caso, é possível utilizar a análise de

marcadores moleculares para estabelecer perfis fenotípicos e assegurar com mais precisão o prognóstico de tumores mamários caninos (VARALLO et al., 2019). Outra possibilidade é uma análise mais detalhada do núcleo celular.

Entre as alterações morfológicas evidenciadas em células tumorais, a estrutura nuclear e tecidual ainda é considerada o melhor critério para diagnosticar os processos neoplásicos. Especificamente, as alterações relacionadas à estrutura do núcleo incluem modificações no tamanho e forma do núcleo, número e tamanho dos nucléolos e textura da cromatina. E podem se relacionar à um determinado tipo e estágio de um tumor ou serem determinadas pelas propriedades funcionais alteradas das células tumorais (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004).

A análise digital de imagens baseado no uso de softwares de domínios públicos, pode possibilitar a análise quantitativa de parâmetros de grande significância prognóstica. Esta abordagem ainda é pouco discutida, porém na área humana, essa metodologia demonstrou-se fundamental para facilitar as análises histopatológicas e fornecer informações possivelmente não acessíveis à percepção visual e não claramente expostas por demais abordagens semiquantitativas (ROXANIS et al., 2018).

Em veterinária, Waldemarin, Beletti e Costa (2004) demonstraram a alta eficácia da análise de imagem computacional da distribuição espacial de eurocromatina e heterocromatina nos núcleos neoplásicos para diagnóstico diferencial entre tumores histopatologicamente muito semelhantes e sugeriu seu possível uso como parâmetro de prognóstico.

Portanto, com base na facilidade de aplicação da análise digital na rotina histopatológica, bem como, no seu alto potencial para diferenciação de tumores, este trabalho busca determinar quais características nucleares e cromatínicas são relevantes para determinar prognóstico e diferenciar os principais tipos de carcinomas mamários que acometem a espécie canina, em especial, nas cadela.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades

Em resposta a constante renovação celular de determinados tecidos do corpo humano, a proliferação celular ocorre de forma contínua e um sistema de controle genético regula esse processo biológico. No entanto, a perda da regulação celular é desencadeada por danos genéticos (mutações) que ocorre inclusive, nos principais genes envolvidos no controle de crescimento celular – proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Essas mutações podem ser somáticas ou hereditárias e são responsáveis por desencadear o câncer, sendo necessário que mais de uma mutação ocorra para que esse se estabeleça (LODISH et al., 2014).

Propriedades diversas são dadas as células que sofreram mutações, essas são menos dependentes de sinais extracelulares, menos propensas a apoptose, capazes de se proliferar indefinidamente, possuem instabilidade genética e capacidade de invasão, sobrevivência e proliferação em locais que seriam inadequados para demais células. E para isso, devem ser capazes de romperem a lâmina basal do epitélio, passar pelos tecidos subjacentes e alcançar a circulação sanguínea ou linfática, além de ter que atrair suprimento sanguíneo necessário para nutrição de um possível tumor (ALBERTS et al., 2011).

Por outro lado, a carcinogênese pode ser desencadeada por mecanismos epigenéticos (HAKE; XIAO; ALLIS, 2003), isto é, alterações que não modificam a sequência do DNA e que a longo prazo possui efeito na expressão gênica. Entre elas, as principais são: a metilação do DNA e as modificações das histonas, que por sua vez, atuam na remodelagem da cromatina e possuem papel na atividade transcricional de um gene (GENEVIÈVE; RASTEGAR; DAVIE, 2009).

Dessa forma, células provenientes de um processo tumoral podem apresentar fenótipo benigno ou maligno. Para estabelecer critérios de malignidade, anormalidades na morfologia do núcleo celular são utilizadas para caracterizar essas células e se baseiam nas características morfológicas do núcleo, irregularidades na membrana nuclear e na distribuição anormal da cromatina. Tais características são importantes para distinção celular, porém aspectos como padrão de crescimento de células malignas, bem como, de tecido conjuntivo ao redor destas células devem ser analisadas para avaliação de biópsias teciduais (FISCHER, 2020).

De modo semelhante à classificação de células normais, realizada conforme origem embrionária, aplica-se a denominação para os diversos tipos de tumores. Portanto, aqueles de origem maligna e que acometem as células epiteliais são conhecidos como carcinoma. Este é o tipo mais comum em seres humanos pois sugere-se maior proliferação dessas células em indivíduos adultos. Por outro lado, sua maior representatividade pode estar relacionada à exposição mais frequente aos danos provocados por agentes físicos e químicos (ALBERTS et al., 2010).

Logo a exposição extrínseca relacionados a substâncias químicas, agentes biológicos e radioativos são reconhecidos como agentes carcinogênicos, isto é, são agentes mutagênicos e capazes de promover o câncer. Identificar esses agentes é fundamental para evitar o desenvolvimento câncer. E de maneira intrínseca, a relação de hormônios sexuais e o câncer de mama podem ajudar a estabelecer a doença (ALBERTS et al., 2010).

Estudos demonstram vários fatores de riscos relacionados à incidência e mortalidade para os diversos tipos de cânceres, sendo estes, potencialmente modificáveis, dentre eles: dieta, obesidade, ingestão de álcool e inatividade física, que por sua vez, poderiam ser minimizados diante de estratégias preventivas e eficazes (ISLAMI et al., 2018). Porém, a crescente prevalência desses fatores, que se observa em vários países, poderá agravar ainda mais as projeções futuras acerca da incidência de câncer (SUNG et al., 2021).

Segundo Sung et al. (2021), o câncer de maior incidência global é o câncer de mama e que já supera o câncer de pulmão, que demonstrou maior número de casos atribuíveis a fatores de riscos (ISLAMI et al., 2018). Estima-se 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama e este representa 11,7% de todos os casos de câncer, sendo responsável pela principal causa de mortalidade por câncer na mulher (SUNG et al., 2021). Em concordância com a espécie humana, na espécie canina o câncer mamário é o mais comum, é muitas vezes acometida por múltiplos tumores e se relaciona a diversos fatores de riscos (MISDORP, 2002).

Em ambas as espécies, aspectos etiológicos, patogênicos e de classificação histológica são similares (GRAY et al., 2020). Em contrapartida, percebe-se uma grande individualização orgânica e heterogeneidade tumoral relacionada à fatores de riscos conhecidos ou não, e por isso, o câncer de mama representa uma doença de comportamento biológico em constante transformação (BRASIL, 2019). No entanto, apesar de estudos prospectivos demonstrarem espécies diversas como

modelos de câncer de mama (MONDAL et al., 2022) a espécie canina ainda representa um modelo em potencial e de grande importância para estudo de câncer de mama em humanos (ABADIE et al., 2018).

2.2 Tumores mamários canino

Na espécie canina, as neoplasias mamárias malignas são as mais frequentes em cadelas, os machos são poucos afetados e quando surgem são histológica e clinicamente benignas (KLOPFLEISCH, 2016). Tumores mamários em cães machos podem estar relacionados a determinadas anormalidades hormonais, por exemplo, aquele que é desenvolvido a partir das células secretoras de estrógeno nos testículos - células de Sertoli (MISDORP, 2002).

Em cadelas, a influência de hormônios sexuais e a condição de castração ou não são os fatores de riscos mais relevantes para o câncer mamário. Estudos relatam que a castração antes do primeiro estro reduz em 200 vezes o risco de tumor, quando comparado a cadelas não castradas (KLOPFLEISCH, 2016). Em concordância, Sorenmo et al. (2011) e Burrai et al. (2020) demonstram que o risco de desenvolver câncer de mama pode ser maior durante os primeiros estros da cadela, já que em cadelas ovariectomizadas, a chance de desenvolver câncer no primeiro estro é de 0,5%, entre primeiro e segundo 8% e após o segundo 26%.

Notavelmente, a ovariectomia possui efeitos protetores nas neoplasias mamárias em cadelas, mas a supressão hormonal provavelmente é mais importante nos primeiros estros, após o segundo estro elas são menos significativas. No caso de exposição endógena, esse efeito parece depender da dose, isto é, maior proteção com exposição mínima. Semelhantemente, a exposição exógena a determinados hormônios - progesterona e estrógenos - pode elevar o risco de desenvolver tumores e quando combinados, maior ainda a possibilidade de malignidade (SORENMO et al., 2011).

Um dos fatores de risco de grande importância, é a idade dos cães. Normalmente, a faixa etária média estabelecida é entre 8 e 11 anos, isso demonstra o maior acometimento em cães mais velhos. Já os cães mais jovens, raramente são acometidos, exceto pelo uso de hormônios exógenos, e são mais propensos a desenvolver tumores benignos. Embora qualquer raça de cães possa ser acometida, algumas delas se sobrepõem (SORENMO et al., 2011) e a maior prevalência de

neoplasias mamárias é observada em raças puras, sendo as raças de pequeno porte as mais afetadas e mais propícias a afecções benignas, enquanto raças maiores são mais acometidas com malignidade (BURRAI et al., 2020).

Por outro lado, fatores pouco explorados, mas não menos importante, a dieta e obesidade são fatores que também relacionam com o risco de tumor mamário canino, mas esse efeito é maior no início da vida de um cão, ou seja, período em que as glândulas mamárias são mais afetadas pelos efeitos hormonais (SORENMO et al., 2011; GRAY et al., 2020).

Estudos sugerem que as neoplasias mamárias caninas são multifatoriais, além de fatores ambientais, são dependentes de uma interação entre múltiplos genes, os principais são o BRCA1 e o BRCA2 (RIVERA et al., 2009). Esses são genes importantes para determinar o risco de câncer de mama em mulheres, sua funcionalidade está relacionada à manutenção da estabilidade do genoma e a desregulação de suas funções pode desencadear o câncer mamário em cães e na mulher (GRAY et al., 2020).

Estima-se que cerca de 60% dos tumores mamários caninos se localizam nas glândulas caudais, mas há possibilidade de ocorrer em várias glândulas concomitantemente (GRAY et al., 2020). Tendo em vista, que normalmente, os cães possuem 5 pares de glândulas (SILVER, 1966), sendo: 2 pares torácicas - cranial e caudal, 2 pares abdominais - cranial e caudal e 1 inguinal (CARVALHO, 2019). Essas glândulas formam ductos, que posteriormente dará origem aos lóbulos e propiciará o desenvolvimento de unidade secretoras (alvéolos) (SORENMO et al., 2011).

Histologicamente, a glândula mamária é classificada como sudorípara apócrina da pele e é composta por um epitélio que é sustentado por tecido mesenquimal, onde pode-se encontrar tecido conjuntivo fibroso, adiposo, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. E sobre a membrana basal que cerca o epitélio, podem ser encontradas células mioepiteliais contráteis e associadas à esta membrana basal, células epiteliais luminais (CARVALHO, 2019).

Uma glândula mamária pode ser acometida por neoplasias composta de nódulos bem demarcados, sem que estes ultrapassem a membrana basal ou podem se infiltrar no tecido mamário circundante. E desse modo, as células apresentam características distintas e irão se dispor de diferentes maneiras, conforme a classificação proposta. Podem estar presentes apenas um tipo de célula: epiteliais ou mioepiteliais – carcinomas simples, as duas populações celulares – carcinomas

complexos e ainda três ou mais componentes celulares – carcinoma misto (GOLDSCHIMIDT et al., 2011).

De acordo com os achados de Canadas et al. (2019), o adenoma complexo é a neoplasia benigna mais frequentemente encontrada e a maligna seria o carcinoma complexo. Mas, é comum as neoplasias de origem benigna, após um período prolongado, adquirem características malignas. Por mais que sejam avaliados clinicamente separados, é notável a interrelação entre natureza benigna e maligna (SORENMO et al., 2011).

Em relação as manifestações clínicas, o aspecto clínico depende de como ele irá se comportar e em que estágio ele se encontra. Esse estágio possui significância prognóstica e por isso representa um papel importante para terapêutica, sendo este, alcançado mediante o Sistema de Estadiamento – TNM, proposto inicialmente pela Organização Mundial de Saúde em 1980 a fim de determinar o estágio da doença, e consequentemente fornecer informações prognósticas para embasar o plano terapêutico. Ele se fundamenta em parâmetros clínicos específicos, como o tamanho do tumor – T, estado dos linfonodos – N e presença de metástase à distância (M) (SORENMO et al., 2011).

E dessa forma, se estabelece quatro estágios para cada parâmetro analisado (I, II, III e IV). Entre os parâmetros analisados, o tamanho do tumor é um dos mais significativos, para este estabeleceu-se diferentes categorias com intervalos de tamanhos diferentes (T1: < 3 cm; T2: 3-5 cm; T3: > 5 cm e T4: qualquer tamanho, na presença de carcinoma inflamatório). Para análise dos linfonodos, é avaliado o envolvimento metastático e se esse é ipsilateral/bilateral, fixo ou não fixo. E por fim, é determinado a presença de metástase à distância (OWEN, 1980).

Para fins terapêuticos, a cirurgia é o tratamento de escolha. Normalmente, a nodulectomia é restrita à nódulos pequenos, isto é, menor que 5mm, firmes e não fixos; a mastectomia simples é indicada para tumor único na primeira glândula torácica; a mastectomia regional (ressecção em bloco) é recomendada se o acometimento envolver as segundas glândulas torácicas ou glândulas abdominais e inguinais, mas se houver tumores múltiplos, fixos e malignos é sugerida a ressecção em cadeia única (MISDORP, 2002).

De modo semelhante ao câncer de mama humano, as terapias adjuvantes são aplicáveis à espécie canina, a quimioterapia combinada parece induzir alguma resposta, porém não foram encontrados relatos suficientes de eficácia em cães

(CASSALI et al., 2020; MISDORP, 2002) e a radioterapia, apesar de pouco utilizada é indicada para casos inoperáveis ou ressecados incompletamente. E quanto às terapias hormonais, ainda há poucos estudos clínicos disponíveis (GRAY et al., 2020).

2.2.1 Classificação dos Tumores Mamários Caninos

Inúmeros métodos de classificação já foram propostos para classificar as neoplasias mamárias canina. Em sua classificação histológica, Goldschmidt et al. (2011) determina critérios importantes para a confirmação de diagnóstico de neoplasias mamárias malignas em cadelas e propõe a seguinte classificação histológica: neoplasias epiteliais malignas, neoplasias epiteliais malignas - tipos especiais, neoplasias mesenquimais malignas (sarcomas), carcinossarcoma (tumor mamário misto maligno), neoplasias benignas, lesões hiperplásicas e displásicas, neoplasias do mamilo e hiperplasia e displasia do mamilo (ANEXO A - Classificação histológica segundo Goldschmidt et al. (2011)).

Entre as neoplasias epiteliais malignas, os carcinomas simples, compostos por apenas um tipo celular, são os mais comuns em cães, sendo a disseminação linfogênica e hematogênica comum. De acordo com sua diferenciação e comportamento biológico, subdividem-se em ordem de malignidade em carcinoma tubulopapilar (formação tubular com ou sem papilas) carcinoma sólido (células dispostas em ninhos, cordões) e carcinoma anaplásico (infiltração difusa) (MISDORP, 2002).

Particularmente, os carcinomas complexos possuem duas populações celulares: um componente epitelial maligno e um componente mioepitelial benigno. Já os carcinomas mistos podem apresentar três ou mais população de células, sendo um componente epitelial maligno e um mesenquimal benigno, que pode ser cartilagens, ossos e/ou tecido adiposo (GOLDSCHIMIDT et al., 2011). Porém, existem ainda classificações distintas que apresentam diferentes tipos de neoplasias mamária em cães (CASSALI et al., 2020).

E para se determinar o grau de malignidade, os principais critérios utilizados são: formação tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Um sistema de pontuação é adotado e são atribuídos pontos (1 a 4) para cada critério conforme as características histológicas encontradas e o grau estabelecido (I, II e III) a partir do

somatório de cada parâmetro analisado. Adicionalmente, necrose nas neoplasias, invasão linfática e peritumoral e metástase de linfonodo regional são avaliados (GOLDSCHIMIDT et al., 2011).

Pesquisas recentes demonstram uma classificação além do tipo de tumor e grau histológico, que se baseia na caracterização fenotípica, na qual são utilizados diferentes biomarcadores a fim de estabelecer um perfil fenotípico para o câncer mamário (ABADIE et al., 2018). No entanto, na veterinária, a expressão de receptores não é comumente analisada, pois alguns destes receptores estão ausentes na maioria das neoplasias mamárias em cães (KLOPFLEISCH, 2016).

2.2.2 Métodos de diagnóstico laboratorial

Para fins de diagnósticos das neoplasias mamárias em cães, alguns sinais clínicos são comuns, como massa palpável sob a pele na região abdominal, seja ela única ou presença de vários nódulos, porém outros sinais são menos evidentes como: inflamação e ulceração, anorexia, perda de peso, letargia e inchaço nos membros posteriores (JOHNSON, 2014), muitos desses apontam para uma possível malignidade, mas é difícil diferenciar a origem maligna ou benigna (MISDORP, 2002).

Normalmente, a biópsia incisional pré-operatória e incisional pós-operatória seguida dos métodos histopatológicos determinam o diagnóstico dos tumores nas glândulas mamárias em cães (MISDORP, 2002). E no caso de doença maligna com suspeita de metástase, exames de imagens podem ser recomendados, ultrassom abdominal e exames radiográficos permitem identificar possíveis locais de infiltração de tumores (SORENMO et al., 2011).

Portanto, o exame histopatológico é considerado o padrão ouro para diagnóstico e classificação de neoplasias das glândulas mamárias (SORENMO et al., 2011). Esta metodologia consiste na fixação da amostra e no processamento histológico da mesma a fim de obter secções finas e coradas em hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise e identificação microscópica de possíveis células neoplásicas (DEY, 2018).

E por imuno-histoquímica, é possível determinar uma classificação baseada em imunofenótipos, que por sua vez, apresenta significância prognóstica e fundamenta-se na expressão de marcadores moleculares, como o receptor de estrógeno alfa (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor fator de crescimento

epidérmico humano – 2 (HER-2) (ABADIE et al., 2018). Estes marcadores além de indicar prognóstico, estabelece o grau histológico e prevê a sobrevida (PASTOR et al., 2020; VARALLO et al., 2019).

Esse método apesar de apresentar limitações na rotina veterinária em virtude dos custos das análises, já demonstra valor prognóstico e preditivo na medicina humana (SILVA, 2018) e pode ser utilizado em cães, podendo até mesmo ser realizado de modo automatizado (CHOCTEAU et al., 2019). Ele fundamenta-se em um preparo prévio de seções histológicas, com recuperação de antígenos, bloqueio de atividades endógenas e reação imunohistoquímica com posterior detecção de células cancerígenas, cujo resultado se baseia na proporção e intensidade da coloração na reação (FERREIRA, E. et al., 2009).

Em suma, os marcadores ER alfa, PR e HER-2, quando analisados por esse método e não detectados pode caracterizar alto grau de malignidade, prognóstico menos favorável e menor sobrevida (PASTOR et al., 2020; VARALLO et al., 2019), já a expressão de ER e PR apenas, indica baixa malignidade, melhor prognóstico e uma maior probabilidade de sobrevivência (PASTOR et al., 2020). Em contrapartida, a detecção de HER-2 ainda é duvidosa, sugere-se que não há ou existem raros casos com detecção positiva para este marcador (ABADIE et al., 2018; NGUYEN et al., 2018; CHOCTEAU et al., 2019).

Por outro lado, estudos também evidenciaram modificações pré-malignas na arquitetura nuclear, especialmente, na organização da cromatina de células microscopicamente normais, mas que poderiam apresentar alterações tumorais iniciais. Isso a partir de microscopia eletrônica de transmissão, que apesar de ser uma metodologia de maior resolução e que permite identificar alterações significativas na distribuição da cromatina e na carcinogênese inicial, ela por sua vez, demonstra-se impraticável, porque além de ser um método demorado e de alto custo ainda exige um processamento diferenciado (CHERKEZYAN et al., 2014).

2.2.3 Prognóstico dos tumores mamários em cães

Na medicina veterinária, o prognóstico é definido por uma série de características clínicas, patológicas (SILVA, 2018) e biológicas, que permitem a previsão da evolução clínica e sobrevivência sem o uso de terapias adicionais após cirurgia inicial (CASSALI et al., 2020). Estudos prospectivos acerca das neoplasias

mamárias demonstram a importância de vários fatores prognósticos. Entre estes, pode-se destacar: o tipo de tumor, tamanho do tumor, grau histológico, grau de infiltração e invasão vascular (MISDORP, 2002). Paralelamente, o estágio tumoral previsto no sistema de estadiamento proposto é de forte significância prognóstica, sistema este, que é afetado pela falta de padronização e por isso, muitas vezes, prejudicam os estudos de estágio e prognóstico (SORENMO et al., 2011).

O tipo de tumor é um fator independente, de grande importância para as pesquisas. Em ordem crescente de malignidade, os carcinomas complexos são considerados menos malignos, seguido pelos carcinomas simples e sarcomas, sendo este o mais maligno. E dentre os carcinomas simples, essa ordem seria o carcinoma não-infiltrante (*in situ*), carcinoma tubulopapilar, carcinoma sólido e carcinoma anaplásico (MISDORP, 2002). Já o carcinoma do tipo misto possui diversos critérios de malignidade, que por sua vez, devem ser utilizados para diferenciar de tumor misto benigno (GOLDSCHIMIDT et al., 2011).

Já o tamanho do tumor é um fator importante não apenas para determinar o prognóstico, mas também para avaliar o comportamento biológico das neoplasias mamárias caninas. Tumores maiores, isto é, maiores que cinco centímetros (T3) são em grande parte de origem maligna e relacionam-se à perda de receptor de progesterona e com maior índice de proliferação, o que de fato, resulta em crescimento elevado do tumor (FERREIRA, E. et al., 2009).

É possível que o prognóstico se modifique, de forma gradual, à medida que o tumor aumenta (SORENMO et al., 2011). No entanto, com base no sistema de estadiamento, a fim de possibilitar uma comparação mais precisa, foi sugerido a substituição do tamanho do tumor clinicamente medido pelo tamanho de tumor patológico, ou seja, aquele medido na lâmina histológica ou na própria amostra já fixada, pois este irá desconsiderar a espessura da pele e uma possível hiperplasia mamária adjacente ao carcinoma (CHOCTEAU et al., 2019).

O sistema de graduação histológica que utiliza diversos critérios de malignidade permite determinar o grau histológico de um tumor, sendo este, considerado um fator prognóstico, porém quando os critérios deste sistema são analisados individualmente não representa importância prognóstica (MISDORP, 2002). Pesquisas relatam, que na presença de inflamação, este fator representa um dos mais fortes relacionados à probabilidade de morte associada ao câncer canino (CHOCTEAU et al., 2019).

A infiltração na pele e em tecidos circundantes e a invasão vascular são parâmetros relevantes para o comportamento maligno de tumores mamários, é muito comum algum grau de crescimento nos tecidos e/ou invasão de vasos em tumores mamários malignos. Infiltrações metastáticas nos linfonodos regionais encontradas em 50% dos cães tratados por mastectomia regional também possui significância prognóstica, porém a falta de padronização do sistema de estadiamento e de procedimentos cirúrgicos podem favorecer resultados conflitantes nos estudos e permitir falhas na detecção de metástases (MISDORP, 2002).

O estágio tumoral é determinado pelo sistema de estadiamento, que por sua vez, requer informações a respeito do tamanho do tumor e o estado do linfonodo. Este se correlaciona de modo direto como desfecho clínico, sendo, portanto, fundamental para implicações terapêuticas, já que um estágio avançado propicia um pior prognóstico, que conseqüentemente, necessitará de uma terapia mais avançada (SORENMO et al., 2011).

Embora vários estudos que incluem parâmetros prognósticos distintos, tais como idade e multicentricidade (ABADIE et al., 2018) e diversos marcadores moleculares, como hormônios ou receptores de sinalização utilizados na área humana e que são capazes de prever resposta terapêutica e fornecer informações de prognóstico (GRAY et al., 2020) confirma-se que o tamanho do tumor, o estado do linfonodo e o estágio tumoral, são de fato, fatores de prognóstico relativamente consistentes e biologicamente aceitáveis, pois as neoplasias mais agressivas crescem mais rápido, são maiores e mais propensas a metástase (SORENMO et al., 2011).

2.3 Tumores mamários canino como modelo biológico para o câncer de mama humano

Semelhantemente ao câncer de mama em mulheres, as neoplasias mamárias malignas que atingem a espécie canina representam um grupo heterogêneo (ABADIE et al., 2017) e de grande complexidade, que requer modelos experimentais abrangentes para seu melhor conhecimento (PINHO et al., 2012). Por acontecer de maneira espontânea, elas possuem um papel importante para evidenciar diversos aspectos biológicos do câncer de mama humano e concluir mais rápido e economicamente os estudos de agentes cancerígenos (GRAY et al., 2020).

Embora demais pesquisas sobre o câncer relatem o uso de modelos

diversos, como aqueles *in vitro*, na qual se pode utilizar as linhagens celulares (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018; PINHO et al., 2012), bem como, aqueles *in vivo*, como os modelos murinos e até de grandes animais, como felinos, primatas não humanos e suínos (MONDAL et al., 2022), a espécie canina é o modelo que melhor representa o câncer humano (PINHO et al., 2012).

Tendo em vista, que os cães são modelos de fácil acesso, que compartilha o mesmo ambiente com seus donos e que esse possui uma menor expectativa de vida conforme sua raça, podendo apresentar de cinco a oito vezes mais acelerado, o processo de envelhecimento do que em humanos, pode-se afirmar que este é um modelo que permite compreender os aspectos genéticos e ambientais de várias doenças que atingem o ser humano, em especial as crônicas ou ligadas ao envelhecimento (ROWEL; MCCARTHY; ALVAREZ, 2011).

Adicionalmente, o modelo canino demonstra-se um sistema imunológico intacto, capaz de representar o crescimento tumoral por algum período em um hospedeiro singênico e um microambiente tumoral, passível de recorrência e metástase. Em termos genéticos, relata-se a semelhança entre genes alvos e as vias de sinalização molecular entre as espécies, o que evidencia o câncer canino como um modelo homólogo para o que acontece no câncer humano (PINHO et al., 2012).

Histologicamente, alguns fatores prognósticos das neoplasias mamárias foram comparados entre as espécies e demonstrado que o tamanho do tumor é similar em cães e humanos, os estágios clínicos, assim como, a invasão de linfonodos ocorre de modo idêntico. Além disso, as duas espécies são afetadas por influências hormonais, no câncer humano, a exposição prolongada pode aumentar o risco de desenvolver um tumor mamário, e em cães não ovariectomizados, pode elevar em até quatro vezes o risco de ocorrer uma neoplasia mamária (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018).

Para parâmetros de diagnósticos, os procedimentos utilizados na medicina humana são facilmente aplicados na espécie canina (GRAY et al., 2020). E como os demais modelos grandes de animais, eles permitem flebotomias seriadas e múltiplas cirurgias de sobrevivências, assim como, ferramentas celulares e moleculares aplicadas em modelos de espécies distintas e até mesmo o uso de dispositivos médicos projetados para a investigação humana (MONDAL et al., 2022).

No entanto, diante da complexidade da doença, um único modelo experimental pode apresentar limitações para reproduzir de maneira completa os

fatores biológicos do câncer humano, por exemplo, a classificação histológica canina ainda carece de fatores prognósticos importantes, como é o caso a expressão de biomarcadores já prevista no câncer humano (PINHO et al., 2012). E diferentemente do que acontece na área humana, não há protocolos amplamente disponíveis nem diretrizes padronizadas para condução de pesquisas com o modelo canino (GRAY et al., 2020).

E adicionalmente, foi demonstrado que a carga de mutações em neoplasias mamários caninos é substancialmente menor do que no câncer humano, isso se deve possivelmente, pelo fato da espécie canina apresentar um menor tempo de desenvolvimento da doença, já que em cães, normalmente um tumor aparece mais precocemente e desse modo há menos tempo para as células acumularem mutações (INGLEBERT et al., 2022). E para a modificação maligna de uma célula, não se sabe quantas são necessárias, mas pode-se afirmar que são mais de uma e que elas acontecem sequencialmente, comumente, por vários anos (ALBERTS et al., 2010).

E por fim, ainda que exista uma população potencial de cães disponíveis para os estudos, há uma diferença significativa entre a terapêutica na espécie humana e a canina. Na espécie canina, a cirurgia é sempre a opção mais recomendada, já no câncer humano o subtipo pode influenciar a terapia. Esta limitação, muitas vezes, pode dificultar os ensaios clínicos e até mesmo impossibilitar pesquisas direcionadas às terapias adjuvantes para os cães (GRAY et al., 2020).

2.4 Análise de imagem aplicada ao câncer de mama

Pesquisas recentes baseiam-se no uso de imagens histológicas para detecção do câncer de mama a partir de um conjunto de dados que fornecem informações importantes para análises de imagens histológicas do câncer mamário. Essas análises são realizadas por um sistema de diagnóstico auxiliado por um computador e constitui várias etapas, como a normalização de cores, segmentação, extração das características e classificação, propriamente dita (RASHMI; PRASAD; UDUPA, 2022).

Nas rotinas histológicas, muitas alterações afetam a distribuição das cores nas imagens histológicas: a heterogeneidade da doença, parâmetros pré-analíticos, como atraso na fixação, bem como, às diferenças ópticas encontradas nos detectores de luz ou fontes de luz de scanners (VETA et al., 2014) e até o processo de preparação

de lâminas, que é variável. E para lidar com essas alterações, a etapa de pré-processamento, conhecida como normalização de cores, é popularmente utilizada (RASHMI; PRASAD; UDUPA, 2022). Estudos propõem vários métodos para normalização das cores, e o método de especificação de histograma RGB é um método simples e rápido, no qual as cores de uma imagem de destino são normalizadas para corresponder as cores da imagem de origem pixel a pixel (HAMIDINEKOO; ZWIGGELAAR, 2017).

Por outro lado, a etapa da segmentação baseia-se na subdivisão de uma imagem em um grupo menor de pixels, cuja finalidade é identificar as regiões de interesse (ROIs), que por sua vez, focaliza-se no núcleo das células, já que sua estrutura e características podem determinar malignidade das neoplasias mamárias (RASHMI; PRASAD; UDUPA, 2022). Porém, essa etapa é considerada desafiadora por sofrer alterações relacionadas à variação de aparência dos tecidos e de células epiteliais malignas, pela sobreposição nuclear e partículas desprezíveis que podem dificultar essa etapa. E quanto ao método de segmentação, há vários com diferentes abordagens, de modo que, a escolha dependerá de fatores importantes como a aplicação pretendida e recursos computacionais disponíveis (VETA et al., 2014).

Já a extração de características fundamenta-se na obtenção de valores numéricos, isto é, a representação do seu conteúdo visual, e este processo é realizado a partir da execução de algoritmos que determinam processos quantitativos na imagem, como por exemplo, o reconhecimento de forma, a estimativa da área, volume entre outros (SANTOS et al., 2019).

A etapa de classificação fundamenta-se em atribuir rótulos a diferentes grupos a partir de características identificadas. Essas características podem estar relacionadas à dados estatísticos e morfológicos, cor e textura e são utilizadas para classificar imagens malignas e benignas. Métodos de classificação abordam diferentes metodologias e podem representar avanços na pesquisa do câncer de mama (RASHMI; PRASAD; UDUPA, 2022). Recentemente, muitos classificadores já foram descritos na literatura utilizando a inteligência artificial nas análises de imagem para diagnosticar (PRABHU et al., 2022) e prever prognóstico para o câncer de mama (ROBERTSON et al., 2018).

Desse modo, a digitalização dos dados na área da patologia, proporciona diagnósticos mais rápidos, reprodutíveis e precisos por meio de análises computadorizadas, além de reduzir possíveis erros humanos e possibilitar o uso de

ferramentas laboratoriais mais eficientes e de maior reprodutibilidade. No entanto, essa rotina digital ainda é pouco empregada nesta área (ROBERTSON et al., 2018), diferentemente de demais áreas da ciência médica que já se prepara diante da revolução tecnológica que acontece em âmbito mundial (SANTOS et al., 2019).

Neste cenário, são muitos os desafios enfrentados para a implementação do processamento de imagem na área da patologia, em especial, no câncer de mama. Em síntese, falta um conjunto de dados que permita a avaliação e comparação apropriada; a etapa de segmentação nuclear é provavelmente a mais custosa pois requer anotações de marcação do núcleo, que podem estar sobrepostos e apresentar alterações características e distribuição aleatória; não há medidas padrão de normalização de cores das imagens e até as próprias características heterogêneas das neoplasias malignas prejudicam a modelagem padrão de diferenciação de neoplasias benignas (RASHMI; PRASAD; UDUPA, 2022).

Todavia, nota-se um crescente interesse na análise de imagens histológicas digitalizadas, que visa facilitar, e se possível, automatizar o diagnóstico e prognóstico na área da patologia. E de fato, o sistema de diagnóstico computadorizado pode operar com alta sensibilidade e especificidade moderada, o que contribui para uma redução significativa na sobrecarga dos patologistas nas rotinas laboratoriais, e adicionalmente, pode reduzir a variabilidade inter e intraobservador do câncer de mama, que é bem documentada, a partir de parâmetros quantitativos extraídos nas análises (VETA et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de amostras

Neste estudo foram analisadas amostras de cadelas com neoplasias mamárias epiteliais malignas, obtidas a partir do arquivo de lâminas já processadas e coradas em hematoxilina-eosina, cujas biópsias foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia nos anos de 2016 e 2017, não exigindo, portanto, a avaliação da Comissão de Ética na Utilização de Animais, conforme parecer 73/2022/CEUA/PROPP/REITO da própria CEUA da UFU.

Os critérios de inclusão foram amostras de cadelas, cujo acompanhamento da evolução do caso foi possível por um período mínimo de dois anos e excluídas deste, amostras cujos dados não permitiram analisar a evolução dos casos e/ou acometidas por neoplasias mamárias que não fosse do tipo epitelial, sendo que o critério de evolução utilizado foi a morte decorrente do tumor que acometeu a cadela. Para fins de prognóstico, cadelas cuja evolução resultou em óbito, no período analisado, determinou-se um prognóstico desfavorável, e se não houve óbito, apresentou-se um prognóstico favorável conforme ANEXO B - Predição prognóstica segundo evolução dos casos analisados.

No caso de cadelas acometidas por mais de um tipo de tumor, foram considerados apenas aqueles de origem maligna (RASOTTO et al., 2017) e de caráter mais agressivo, isso permite identificar o tumor que mais afeta a evolução dos casos. Para isso, utilizou-se 74 lâminas com os seguintes tipos de neoplasias mamárias epiteliais: carcinoma tipo misto (24), carcinoma tubular (19), carcinoma tipo complexo (12), carcinoma tubulopapilar (7), carcinoma sólido (5), carcinoma papilar (4), carcinoma tubular-cístico (2) e carcinoma micropapilar invasivo (1), sendo a confirmação do tipo de tumor feita por dois patologistas experientes.

3.2 Segmentação e processamento de imagens

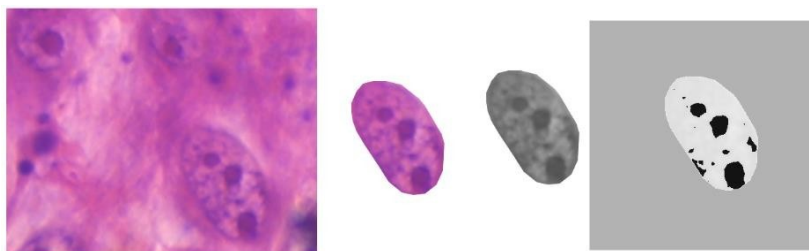
Imagens digitais em arquivo bitmap foram obtidas de cada lâmina utilizando-se um microscópio (Leica DMNR500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100X. Conforme Waldemarin, Beletti e Costa (2004), foram capturadas imagens em número suficiente para alcançar

100 núcleos de células neoplásicas por cada lâmina.

Os núcleos foram segmentados de forma interativa, utilizando o *software Image J* e colado em uma nova figura em branco, cuja dimensão era de 150x150 pixels e salvo em arquivo bitmap. Tomou-se cuidado de serem segmentados apenas núcleos de células neoplásicas e não sobrepostos. Em seguida, os núcleos foram transformados em escala de cinza, isto é, valores de pixels entre 0 (preto) e 255 (branco) e analisados em algoritmo desenvolvido em ambiente de programação matemática *Scilab* (WALDEMARIN; BELETTI; COSTA, 2004).

Esse algoritmo inicialmente realiza a segmentação por limiarização (*threshold*) dos nucléolos e heterocromatina. O limiar utilizado foi 80% do valor médio dos pixels do núcleo, sendo que os pixels com valor menor do que o limiar foram transformados em negro e os acima desse valor, foram transformados em branco, obtendo-se assim uma imagem binária. Essa segmentação fez com que o(s) nucléolo(s) e a heterocromatina ficassem em negro e a eucromatina, em branco. Para as avaliações posteriores, o fundo da imagem, antes branco, foi transformado em cinza (Figura 1), diferenciando este da eucromatina. As estruturas em negro, ou seja, nucléolo(s) e heterocromatina, passaram a ser consideradas as regiões de interesse (ROI's), desde que tivesse mais que quatro pixels em sua constituição. Considerou-se estruturas com quatro ou menos pixel como sendo ruído e por isso foram eliminadas.

Figura 1: Representação da segmentação de um núcleo extraído de tecido neoplásico.



Fonte: A autora.

Legenda: Tecido neoplásico em coloração de hematoxilina-eosina, posteriormente núcleo segmentado e núcleo em escala de cinza; após segmentação por limiarização foi obtida imagem binária demonstrando a heterocromatina e nucléolo em negro e a eucromatina em branco.

Finalizada essa etapa, passaram a ser mensuradas as seguintes características conforme Waldemarin (2003): a área do núcleo (A), o perímetro do núcleo (P), o comprimento ou eixo maior do núcleo (C), a largura ou eixo menor do

núcleo (L), a razão entre largura e comprimento do núcleo (L/C), a elipticidade do núcleo (E), o número de ROIs (nr), a área média dos ROIs (Amr), o perímetro médio dos ROIs (Pmr), a distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos ROIs (DMnr), o alongamento do principal ROI (Alr).

Além dessas medidas também foram avaliadas as seguintes características: fator de forma (FF) (FERREIRA, R. C. et al., 2009) simetria lateral (SL) e simetria anteroposterior (SAP) (BELETTI; COSTA; VIANA, 2005).

Na tentativa de melhor caracterizar a distribuição dos ROIs no interior do núcleo foram criadas novas abordagens: coeficiente da área dos ROIs (CoAr), que seria a razão entre o desvio padrão da área dos ROIs e a área média dos ROIs; coeficiente do perímetro dos ROIs (CoPr), que seria a razão entre o desvio padrão dos perímetros dos ROIs e o perímetro médio dos ROIs; razão entre coeficiente área-perímetro ($\text{CoAr}/(\text{CoPr})^2$), que seria a razão entre coeficiente da área dos ROIs e coeficiente do perímetro dos ROIs elevado ao quadrado; razão entre desvio padrão área-perímetro ($\text{DPar}/(\text{DPPr})^2$), que seria a razão entre o desvio padrão da área dos ROIs e o desvio padrão do perímetro dos ROIs elevado ao quadrado.

Para melhor caracterizar o polimorfismo nuclear também foram considerados como características a serem avaliadas todos os desvios padrões das variáveis anteriormente descritas, com exceção dos desvios padrões dos coeficientes (CoAr, CoPr, $\text{CoAr}/(\text{CoPr})^2$), que já estariam relacionadas com o polimorfismo, bem como, o número de ROIs (nr), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos ROIs (DMnr), alongamento do principal ROI (Alr) e razão entre desvio padrão área-perímetro ($\text{DPar}/(\text{DPPr})^2$).

3.3 Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software *Splus 2000 Professional* (MathSoft, Inc).

Inicialmente foi realizada análise de discriminante canônica com todos os casos, independentemente do tipo de tumor, tendo como variável dependente o prognóstico. Possuindo a variável dependente apenas dois possíveis resultados, favorável e desfavorável, foi gerado apenas uma função discriminante, constituída por um coeficiente canônico para cada característica (variável) avaliada. Assim, aplicando-se essa função, chega-se a um valor para cada caso, o qual foi utilizado

para definir qual o provável prognóstico deste caso. Para aplicação desta função foi necessário fazer a somatória da multiplicação do valor de cada coeficiente canônico pela média da variável correspondente, referente a todos os núcleos do caso analisado. O valor desta somatória define o prognóstico a partir de ponto de corte. Este ponto de corte é definido pela somatória da multiplicação do valor de cada coeficiente canônico pela média da variável correspondente, referente a todos os casos utilizados na análise de discriminante somado a uma constante.

Também foi gerada a estrutura canônica, composta pelo módulo do resultado da multiplicação do coeficiente canônico de cada variável pela média do valor de cada variável de todos os casos utilizados na análise de discriminante. Os resultados da estrutura canônica representam a relevância de cada variável no processo de discriminação, sendo criado um ranking das variáveis segundo sua importância no prognóstico.

Posteriormente foi realizada análise de discriminante canônica apenas com os casos de carcinoma tipo misto, tendo como variável dependente o prognóstico. Nessa análise foram utilizadas somente as 17 variáveis mais relevantes (valor da estrutura canônica maior que cinco) na análise com todos os tipos de tumores. Semelhante ao realizado na análise de discriminante inicial, foi construída a estrutura canônica para se identificar as variáveis mais relevantes para o prognóstico de carcinoma tipo misto. Foi feita também uma análise de discriminante para o carcinoma tubular similar a realizada para carcinoma tipo misto.

Finalmente foi realizada uma análise de discriminante para diagnóstico diferencial entre carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo, que são os três tipos de tumores com maior número de casos. O número de casos dos outros cinco tipos de tumores não possibilitaram que eles fossem utilizados nesta análise. Para esta análise foram utilizadas todas as variáveis avaliadas e a variável dependente foi o tipo de tumor. Possuindo a variável dependente três possíveis resultados (carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo), foram geradas duas funções discriminantes e duas estruturas canônicas.

Com o intuito de se verificar a eficácia de cada função discriminante, os mesmos casos utilizados em cada análise foram aplicados nas funções geradas. Assim, foi possível determinar o percentual de acerto para cada uma das cinco funções criadas.

4 RESULTADOS

A análise discriminante canônica realizada gerou uma função discriminante para predição prognóstica, independentemente do tipo de tumor e abrangendo todas as características propostas. Essa função discriminante é representada pelos coeficientes canônicos de cada variável analisada e são demonstrados na Tabela 1. A média da aplicação da função canônica a todos os casos que foram utilizados para sua geração definiu o ponto de corte, que foi -197,16.

Tabela 1: Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama.

Características	Coeficiente canônico
A	0,0064
P	-0,0124
C	2,033
L	-2,131
L/C	-40,444
E	293,548
FF	-41,860
SL	-157,656
SAP	8,679
CoPr	12,988
CoAr/(CoPr) ²	0,146
CoAr	-10,263
Amr	0,061
Pmr	-0,107
Alr	3,986
nr	-0,181
DMnr	0,289
DPAr	-0,050
DPPr	0,055
DPAr/(DPPr) ²	-10,360
DPA	-0,135
DPP	0,206
DPC	-0,333
DPL	0,509
DPL/C	0,636

DPE	0,038
DPFF	0,113
DPSL	-0,822
DPSAP	-0,593

Legenda: área do núcleo (A), perímetro do núcleo (P), comprimento do núcleo (C), largura do núcleo (L), razão entre largura e comprimento do núcleo (L/C), elipticidade do núcleo (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL), simetria anteroposterior (SAP), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), razão entre coeficiente da área dos Rois e coeficiente do perímetro dos Rois elevado ao quadrado ($\text{CoAr}/(\text{CoPr})^2$), coeficiente da área dos Rois (CoAr), área média dos Rois (Amr), perímetro médio dos Rois (Pmr), alongamento do principal Roi (Alr), número de Rois (nr), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos Rois (DMnr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), desvio padrão do perímetro dos Rois (DPPr), razão entre o desvio padrão da área dos Rois e o desvio padrão do perímetro dos Rois elevado ao quadrado ($\text{DPAr}/(\text{DPPr})^2$), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão do perímetro do núcleo (DPP), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão da razão entre da largura e comprimento do núcleo (DPL/C), desvio padrão da elipticidade do núcleo (DPE), desvio padrão do fator forma (DPFF), desvio padrão da simetria lateral (DPSL), desvio padrão da simetria anteroposterior (DPSAP).

Já a estrutura canônica foi calculada a partir dos coeficientes canônicos e a média das características analisadas. Os valores encontrados para cada características foram descritos em ordem decrescente, isto é, em ordem de relevância para determinar prognóstico (Tabela 2). Portanto, a largura, o comprimento e a simetria lateral do núcleo foram as características mais relevantes para definir o prognóstico.

Tabela 2: Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama.

Características	Estrutura canônica
L	210,5686085
C	168,5198327
SL	144,8219497
FF	34,89699887
L/C	33,62067224
E	28,74391134
A	14,88651727
DPL	13,92392119
DPC	12,67191824
CoAr	10,6126345
CoPr	10,48627036
Pmr	10,03408364
DPL/C	9,762372755
Amr	9,179341751

SAP	7,9750392
DPAr	6,209728066
DMnr	5,109093284
DPA	4,277129307
DPSL	4,187601536
DPPr	3,695229237
DPP	3,362427927
DPSAP	3,183886529
DPE	3,101877367
P	1,99714972
DPFF	1,26923524
Alr	1,103711784
nr	0,82768311
$DPAr/(DPPr)^2$	0,721109793
$CoAr/(CoPr)^2$	0,538391959

Legenda: largura do núcleo (L), comprimento do núcleo (C), simetria lateral (SL), fator forma (FF), razão entre largura e comprimento do núcleo (L/C), elipticidade do núcleo (E), área do núcleo (A), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), coeficiente da área dos Rois (CoAr), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), perímetro médio dos Rois (Pmr), desvio padrão da razão entre largura e comprimento (DPL/C), área média dos Rois (Amr), simetria anteroposterior (SAP), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos Rois (DMnr), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão da simetria lateral (DPSL), desvio padrão do perímetro dos Rois (DPPr), desvio padrão do perímetro do núcleo (DPP), desvio padrão da simetria anteroposterior (DPSAP), desvio padrão da elipticidade do núcleo (DPE), perímetro do núcleo (P), desvio padrão do fator forma (DPFF), alongamento do principal Roi (Alr), número de Rois (nr), razão entre o desvio padrão da área dos Rois e o desvio padrão do perímetro dos Rois elevado ao quadrado ($DPAr/(DPPr)^2$), razão entre o coeficiente da área dos Rois e o coeficiente do perímetro dos Rois elevado ao quadrado ($CoAr/(CoPr)^2$).

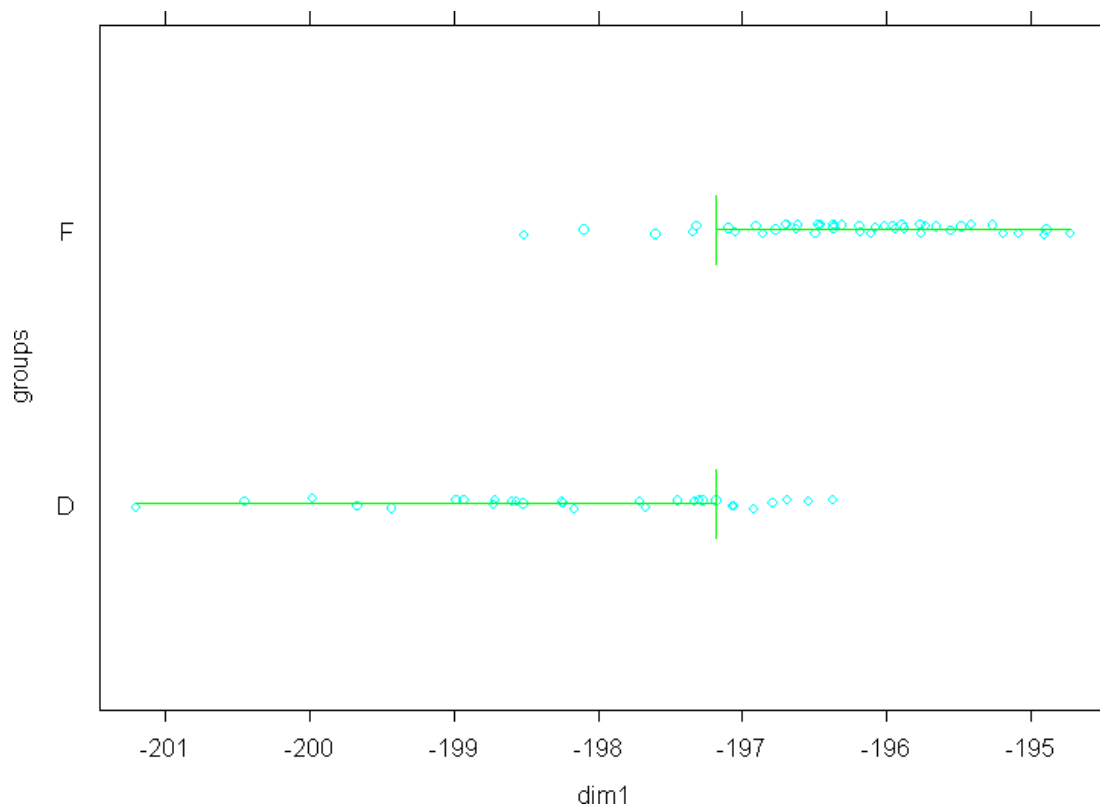
Para verificar a eficiência da função discriminante, a mesma foi aplicada para todos os casos utilizados para a sua construção. O número e porcentagem de erros dessa aplicação foram demonstrados na Tabela 3. Ou seja, dos 29 casos que tiveram sabidamente evolução desfavorável, 22 foram assim prognosticados e sete receberam erroneamente o prognóstico de favorável. Já dos 45 casos que tiveram evolução favorável, 40 foram assim prognosticados e cinco receberam o prognóstico de desfavorável.

Tabela 3: Estimativa de erros de predição de prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama conforme função discriminante para os casos independentemente do tipo de tumor de mama.

Prognóstico	Desfavorável	Favorável	Porc. erros
Desfavorável	22	7	24,1%
Favorável	5	40	11,1%
Total			35,2%

A Figura 2 demonstra os acertos e erros de prognósticos após a aplicação da função discriminante para cada um dos casos utilizados para a construção desta função.

Figura 2: Erros e acertos de prognóstico independentemente do tipo de tumor de mama, de todos os casos, após aplicação da função discriminante em relação ao ponto de corte.



Fonte: A autora.

Figura 2: Representação dos casos analisados (círculos azuis) segundo o ponto de corte (-197,16, representado pelo traço vertical verde) estabelecido pela função discriminante para prognóstico favorável (F) e desfavorável (D) para qualquer que seja o tipo de tumor. No grupo de casos sabidamente com evolução favorável (F), os casos com valor discriminante maior do que o ponto de corte (à direita) foram classificados corretamente, porém aqueles casos localizados abaixo do ponto de corte (à esquerda) foram classificados incorretamente como desfavoráveis. Para o grupo de casos sabidamente com

evolução desfavorável (D), os casos localizados abaixo do ponto de corte foram de fato, classificados como desfavoráveis, já os casos que estão acima deste valor refere-se aqueles que foram erroneamente classificados como favoráveis.

Posteriormente, foi realizada uma análise discriminante, que gerou uma função discriminante para predição prognóstica apenas para carcinoma tipo misto e utilizando as 17 variáveis mais relevantes na primeira análise discriminante. Os coeficientes canônicos das variáveis analisadas que representam esta função estão descritos na Tabela 4. A média da aplicação da função canônica a todos os casos que foram utilizados para sua geração definiu o ponto de corte que foi 122,00.

Tabela 4: Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico de carcinoma misto mamário.

Características	Coeficiente canônico
A	-0,0145
C	-11,522
L	10,261
L/C	170,059
E	-1.896,677
FF	-4,868
SL	-65,974
SAP	229,865
CoPr	-16,447
CoAr	-1,993
Amr	-0,131
Pmr	0,436
DPAr	-0,045
DPA	-0,034
DPC	3,605
DPL	-4,717
DPL/C	-0,476

Legenda: área do núcleo (A), comprimento do núcleo (C), largura do núcleo (L), razão entre largura e comprimento do núcleo (L/C), elipticidade do núcleo (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL), simetria anteroposterior (SAP), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), coeficiente da área dos Rois (CoAr), área média dos Rois (Amr), perímetro médio dos Rois (Pmr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão da razão entre a largura e comprimento do núcleo (DPL/C).

A estrutura canônica foi calculada e o valor obtido para cada característica foram demonstrados em ordem decrescente na Tabela 5. A largura, comprimento e

simetria anteroposterior do núcleo foram as características mais relevantes para definir o prognóstico em carcinoma do tipo misto.

Tabela 5: Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico de carcinoma tipo misto.

Características	Estrutura canônica
L	1014,798226
C	947,5582895
SAP	210,1063407
E	195,9109472
DPC	140,6457334
L/C	140,0932199
DPL	130,747429
SL	60,26984243
A	33,206657
Pmr	33,10109854
Amr	14,5795998
CoPr	12,56480177
DPL/C	7,845817056
DPAr	4,565794585
FF	4,111477129
CoAr	1,967782851
DPA	1,151559579

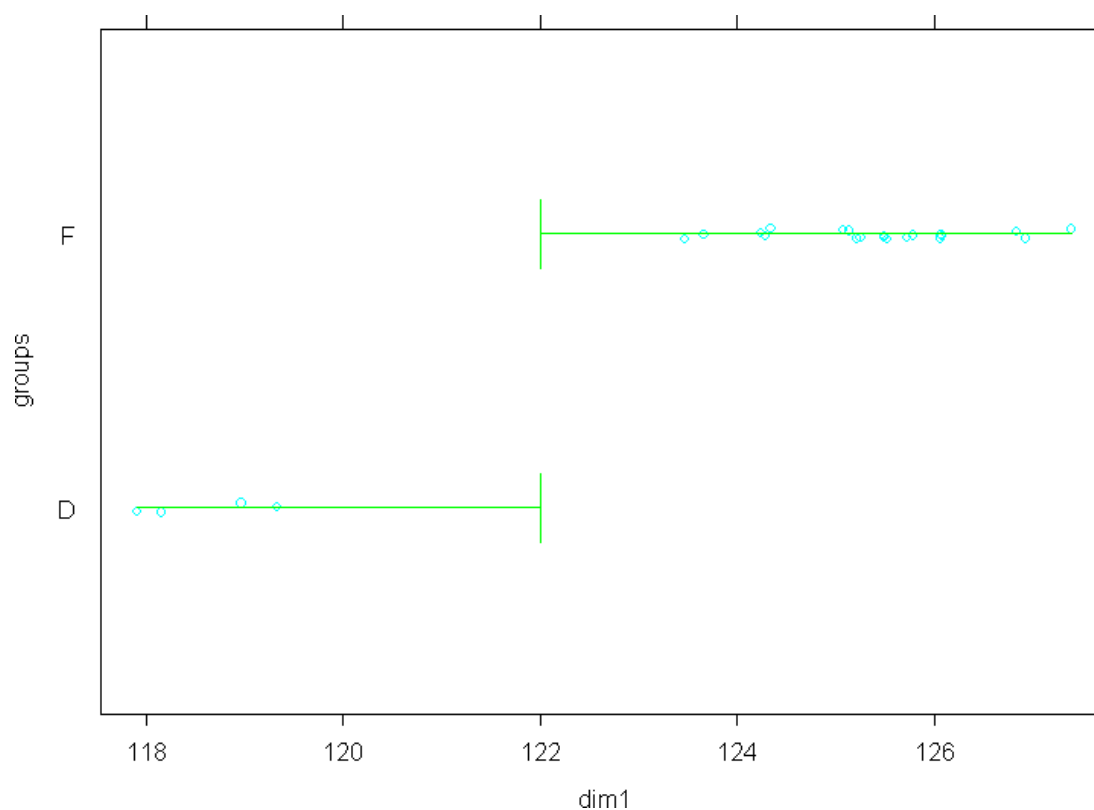
Legenda: largura do núcleo (L), comprimento do núcleo (C), simetria anteroposterior (SAP), elipticidade do núcleo (E), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), razão entre largura e comprimento do núcleo (L/C), desvio padrão da largura (DPL), simetria lateral (SL), área do núcleo (A), perímetro médio dos Rois (Pmr), área média dos Rois (Amr), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), desvio padrão da razão entre largura e comprimento do núcleo (DPL/C), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), fator forma (FF), coeficiente da área dos Rois (CoAr), desvio padrão da área do núcleo (DPA).

Curiosamente, a função discriminante teve margem zero de erro estimado, o que significa que todos os casos foram classificados corretamente (Tabela 6 e Figura 3).

Tabela 6: Estimativa de erros de predição de prognóstico conforme função discriminante para os casos de carcinoma tipo misto.

Prognóstico	Desfavorável	Favorável	Porc. Erros
Desfavorável	4	0	0%
Favorável	0	20	0%
Total			0%

Figura 3: Distribuição de todos os casos de carcinoma misto com base no ponto de corte.



Fonte: A autora.

Figura 3: Representação dos casos analisados (círculos azuis) segundo o ponto de corte (122,00, representado pelo traço vertical verde) estabelecido pela função discriminante para prognóstico favorável (F) e desfavorável (D) para carcinoma misto mamário. Para o grupo de casos sabidamente com prognóstico favorável (F) os casos analisados apresentaram valor discriminante maior do que o ponto de corte (à direita) sem que nenhum caso fosse classificado incorretamente como desfavorável (D), já o grupo de casos sabidamente com prognóstico desfavorável (D) os casos analisados apresentaram valor discriminante menor do que o ponto de corte (à esquerda), e semelhantemente nenhum caso foi classificado incorretamente como favorável (F).

Em seguida, uma nova análise discriminante foi realizada, a qual obteve-se uma função discriminante para predição prognóstica apenas para os casos de carcinoma tubular. Para isso, utilizou-se mesmas variáveis avaliadas para o carcinoma tipo misto e os coeficientes canônicos de cada uma dessas variáveis foram

descritos na Tabela 7. O ponto de corte obtido após a média da aplicação da função canônica foi equivalente a -2090,91.

Tabela 7: Coeficientes canônicos da função discriminante para prognóstico de carcinoma tubular.

Características	Coeficiente canônico
A	-0,057
C	-21,989
L	22,249
L/C	22,249
E	-4.658,069
FF	-776,033
SL	-361,784
SAP	-849,147
CoPr	-83,862
CoAr	95,144
Amr	-0,016
Pmr	0,505
DPAr	-0,317
DPA	0,706
DPC	3,208
DPL	-4,554
DPL/C	0,284

Legenda: área do núcleo (A), comprimento do núcleo (C), largura do núcleo (L), razão entre largura e comprimento (L/C), elipticidade do núcleo (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL), simetria anteroposterior (SAP), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), coeficiente da área dos Rois (CoAr), área média dos Rois (Amr), perímetro médio dos Rois (Pmr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão da razão entre a largura e comprimento do núcleo (DPL/C).

A estrutura canônica foi calculada e o valor obtido para cada característica dos casos de carcinoma tubular foram demonstrados na Tabela 8. Para este tipo, as características que mais afetaram o prognóstico foram a largura, o comprimento e a simetria anteroposterior do núcleo.

Tabela 8: Estrutura canônica da função discriminante para prognóstico de carcinoma tubular.

Características	Estrutura canônica
L	2171,109911
C	1816,174717
SAP	782,6903814
FF	642,2694963
E	437,6133485
SL	333,1650986
L/C	182,3174133
DPL	128,6513415
A	126,693506
DPC	124,9399929
CoAr	99,73099295
CoPr	68,39573023
Pmr	44,96352836
DPAr	35,86325932
DPA	21,03452071
DPL/C	4,086705422
Amr	2,242963085

Legenda: largura do núcleo (L), comprimento do núcleo (C), simetria anteroposterior (SAP), fator forma (FF), elipticidade do núcleo (E), simetria lateral (SL), razão entre a largura e comprimento (L/C), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), área do núcleo (A), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), coeficiente da área dos Rois (CoAr), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), perímetro médio dos Rois (Pmr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão da razão entre largura e comprimento do núcleo (DPL/C), área média dos Rois (Amr).

Segundo a estimativa de erros de predição de prognóstico para os casos de carcinoma tubular não houve nenhuma porcentagem de erro para os casos analisados, ou seja, nenhum caso de carcinoma tubular foi classificado incorretamente (Tabela 9).

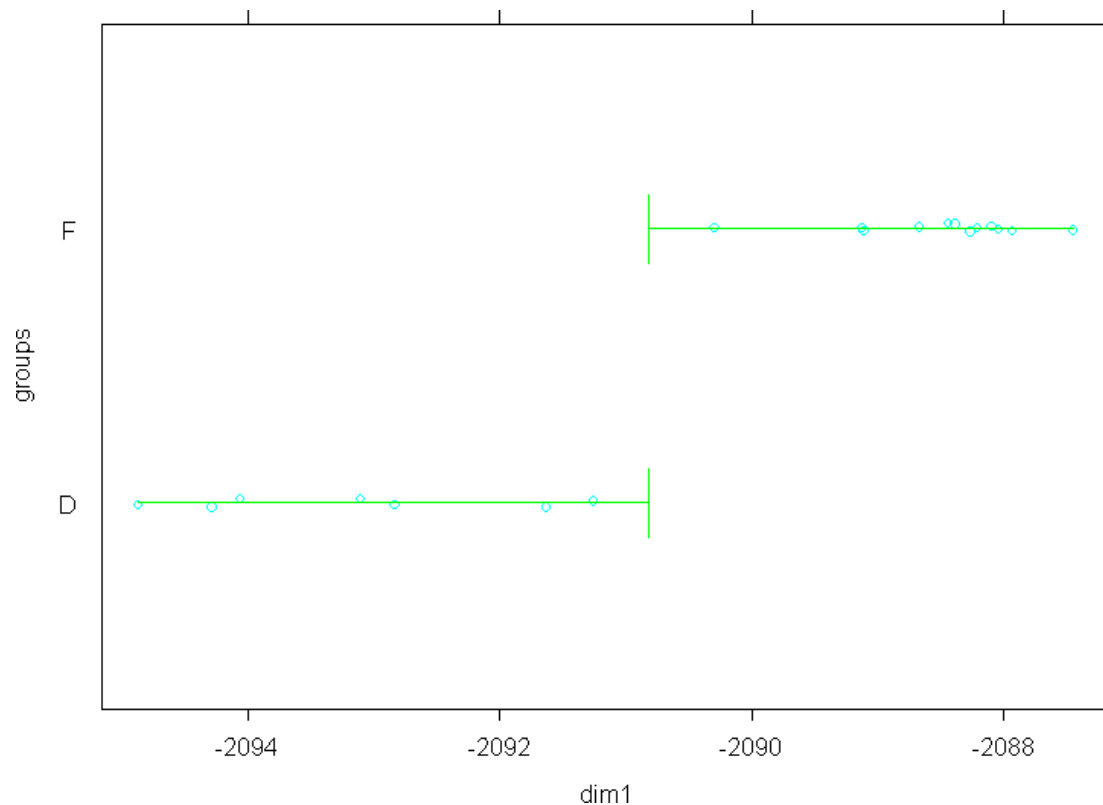
Tabela 9: Estimativa de erros de predição de prognóstico conforme função discriminante para os casos de carcinoma tubular.

Prognóstico	Desfavorável	Favorável	Porc. erros
Desfavorável	7	0	0%
Favorável	0	12	0%
Total			0%

A distribuição de todos os casos de carcinoma tubular com base no ponto

de corte foi demonstrada na Figura 4.

Figura 4: Distribuição de todos os casos de carcinoma tubular com base no ponto de corte.



Fonte: A autora.

Figura 4: Representação dos casos analisados (círculos azuis) segundo o ponto de corte (-2090,91, representado pelo traço vertical verde) estabelecido pela função discriminante para prognóstico favorável (F) e desfavorável (D) para carcinoma tubular. Em ambos os grupos, todos os casos de carcinoma tubular foram classificados conforme prognóstico previsto, isto é, aqueles que sabidamente possuía prognóstico favorável (F) demonstraram valor discriminante maior do que -2090,91 (à direita) e aqueles que sabidamente possuía prognóstico desfavorável (D) demonstraram valor discriminante menor do que o ponto de corte (à esquerda).

Por fim, a metodologia proposta foi utilizada como ferramenta de diagnóstico. Para isso, duas funções discriminantes foram utilizadas para realizar a diferenciação entre carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo e consequentemente, dois coeficientes canônicos foram determinados e duas estruturas canônicas estabelecidas. Os coeficientes canônicos das funções discriminantes 1 e 2 estão representados na Tabela 10. O resultado da função

discriminante 1 aplicando-se a média dos valores de cada variável de todos os casos utilizados para a geração da função foi 506,48 e da função 2 foi -1233,21.

Tabela 10: Coeficientes canônicos das duas funções discriminantes utilizadas para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.

Características	Coeficiente canônico 1	Coeficiente canônico 2
A	0,00790128	0,009373458
P	-0,04077788	-0,001231184
C	2,25284	2,502698
L	-2,399118	-2,608097
L/C	503,6608	-1358,317
E	1042,409	-1399,516
FF	31,62292	32,96384
SL	-38,12374	34,19935
SAP	30,49876	-34,25374
CoPr	-3,007655	11,97965
CoAr/(CoPr) ²	-0,000511034	0,03669781
CoAr	9,775372	4,634373
Amr	0,06917318	0,006025419
Pmr	-0,1589842	-0,01883193
Alr	-9,743531	12,92481
nr	-1,36836	-0,05677073
DMnr	0,2936802	-0,2341215
DPAr	-0,05167517	0,01655153
DPPr	0,1056234	-0,1069854
DPAr/(DPPr) ²	-5,891452	-3,458895
DPA	0,005950343	0,3938145
DPP	0,1554533	-0,7510095
DPC	0,01822618	-0,3560232
DPL	0,04712849	0,9118995
DPL/C	1,291456	-0,7885296
DPE	-0,144847	0,4101247
DPFF	-0,2601961	-0,5369365
DPSL	-0,5559554	0,8190357
DPSAP	-0,3464098	-0,6860305

Legenda: área do núcleo (A), perímetro do núcleo (P), comprimento do núcleo (C), largura do núcleo (L), razão entre a largura e comprimento do núcleo (L/C), elipticidade do núcleo (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL), simetria anteroposterior (SAP), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), razão

entre coeficiente da área dos Rois e coeficiente do perímetro dos Rois elevado ao quadrado ($\text{CoA}/(\text{CoPr})^2$), coeficiente da área dos Rois (CoAr), área média dos Rois (Amr), perímetro médio dos Rois (Pmr), alongamento do principal Roi (Alr), número dos Rois (nr), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos Rois (DMnr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), desvio padrão do perímetro dos Rois (DPPr), razão entre o desvio padrão da área dos Rois e o desvio padrão do perímetro dos Rois ao quadrado ($\text{DPAr}/(\text{DPPr})^2$), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão do perímetro do núcleo (DPP), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão da razão entre a largura e comprimento do núcleo (DPL/C), desvio padrão da elipticidade do núcleo (DPE), desvio padrão do fator forma (DPFF), desvio padrão da simetria lateral (DPSL), desvio padrão da simetria anteroposterior (DPSAP).

Os valores encontrados para as duas estruturas canônicas (1 e 2 respectivamente) que foram estabelecidas para os três tipos de tumores analisados estão descritos nas Tabelas 11 e 12. Para a duas estruturas canônicas, a característica mais relevante para diferenciação foi a razão largura pelo comprimento, largura e comprimento do núcleo celular.

Tabela 11: Estrutura canônica da função discriminante 1 para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.

Características	Estrutura canônica 1
L/C	417,3058665
L	235,8784464
C	185,3287767
E	103,899748
SL	34,93728849
SAP	27,96902649
FF	26,47183381
DPL/C	20,08324441
A	17,93545566
Pmr	14,19094415
DPE	11,70016391
CoAr	9,807897329
Amr	9,577355029
DPPr	6,662685663
P	6,50447519
nr	6,032178707
DPAr	5,867217593
DMnr	5,17574509
DPFF	3,043461742
DPSL	2,931148493

Alr	2,617643892
DPP	2,577364838
CoPr	2,358220259
DPSAP	1,917346751
DPL	1,300512395
DPC	0,70244957
DPAr/(DPPr) ²	0,466817233
DPA	0,190986428
CoAr/(CoPr) ²	0,002210294

Legenda: razão entre a largura e comprimento do núcleo (L/C), largura do núcleo (L), comprimento do núcleo (C), elipticidade do núcleo (E), simetria lateral (SL), simetria anteroposterior (SAP), fator forma (FF), desvio padrão da razão entre a largura e comprimento do núcleo (DPL/C), área do núcleo (A), perímetro médio dos Rois (Pmr), desvio padrão da elipticidade do núcleo (DPE), coeficiente da área dos Rois (CoAr), área média dos Rois (Amr), desvio padrão do perímetro dos Rois (DPPr), perímetro do núcleo (P), número dos Rois (nr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos Rois (DMnr), desvio padrão do fator forma (DPFF), desvio padrão da simetria lateral (DPSL), alongamento do principal Roi (Alr), desvio padrão do perímetro do núcleo (DPP), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), desvio padrão da simetria anteroposterior (DPSAP), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da área dos Rois e o desvio padrão do perímetro dos Rois elevado ao quadrado (DPAr/(DPPr)²), desvio padrão da área (DPA), razão entre o coeficiente da área dos Rois e coeficiente do perímetro dos Rois elevado ao quadrado (CoAr/(CoPr)²).

Tabela 12: Estrutura canônica da função discriminante 2 para diferenciação de carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.

Características	Estrutura canônica 2
L/C	1125,427376
L	256,4250147
C	205,8832224
E	139,4935766
DPE	33,12824022
SAP	31,41254797
SL	31,34090615
FF	27,59433014
DPL	25,16389986
A	21,27721588
DPC	13,72138011
DPA	12,64014944
DPP	12,45149173
DPL/C	12,26230911
CoPr	9,392916847
DPPr	6,748600128
DPFF	6,280438853

CoAr	4,649792823
DPSL	4,318179584
DMnr	4,126097721
DPSAP	3,797116451
Alr	3,472308956
DPAr	1,879266735
Pmr	1,680939784
Amr	0,834247854
DPAr/(DPPr) ²	0,274070262
nr	0,250263957
P	0,196386026
CoAr/(CoPr) ²	0,158723366

Legenda: razão entre a largura e comprimento do núcleo (L/C), largura do núcleo (L), comprimento do núcleo (C), elipticidade do núcleo (E), desvio padrão da elipticidade do núcleo (DPE), simetria anteroposterior (SAP), simetria lateral (SL), fator forma (FF), desvio padrão da largura do núcleo (DPL), área do núcleo (A), desvio padrão do comprimento do núcleo (DPC), desvio padrão da área do núcleo (DPA), desvio padrão do perímetro do núcleo (DPP), desvio padrão da razão entre a largura e o comprimento do núcleo (DPL/C), coeficiente do perímetro dos Rois (CoPr), desvio padrão do perímetro dos Rois (DPPr), desvio padrão do fator forma (DPFF), coeficiente da área dos Rois (CoAr), desvio padrão da simetria lateral (DPSL), distância média entre o centro de massa do núcleo e o centro de massa dos Rois (DMnr), desvio padrão da simetria anteroposterior (DPSAP), alongamento do principal Roi (Alr), desvio padrão da área dos Rois (DPAr), perímetro médio dos Rois (Pmr), área média dos Rois (Amr), razão entre o desvio padrão da área dos Rois e o desvio padrão do perímetro dos Rois elevado ao quadrado (DPAr/(DPPr)²), número dos Rois (nr), perímetro do núcleo (P), razão entre o coeficiente da área dos Rois e o coeficiente do perímetro dos Rois elevado ao quadrado (CoAr/(CoPr)²).

Todos os casos classificados histologicamente como carcinoma complexo (12) foram devidamente classificados segundo as análises discriminantes, porém dois casos de carcinoma misto (24) foram classificados incorretamente, um como carcinoma complexo e outro como carcinoma tubular, já para os carcinomas tubulares (19) dois casos foram classificados errados, um como carcinoma complexo e outro como carcinoma tipo misto (Tabela 13).

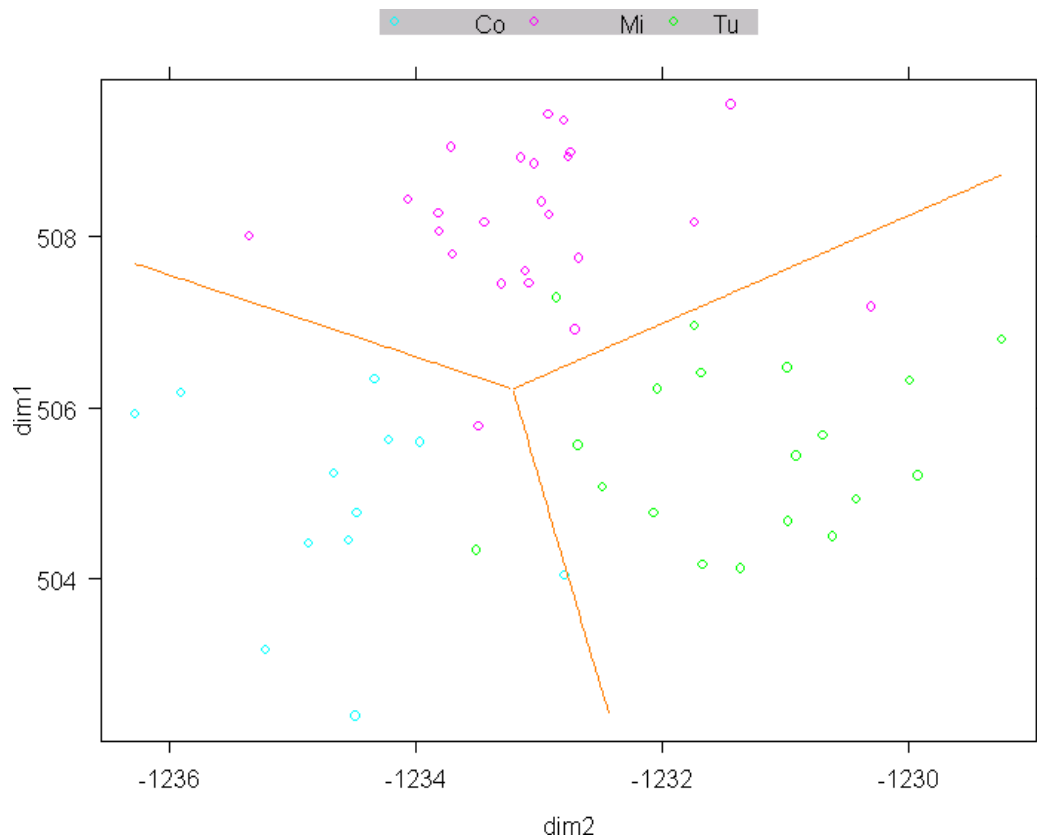
Tabela 13: Estimativa de erros de diferenciação de tipos de tumor utilizando as funções discriminantes para carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma tipo complexo.

Tipo de tumor	Co	Mi	Tu	Porc. Erros
Co	12	0	0	0,00%
Mi	1	22	1	8,3%
Tu	1	1	17	10,5%
Total				18,8%

Legenda: carcinoma tipo complexo (Co), carcinoma tipo misto (Mi), carcinoma tubular (Tu).

A distribuição do carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma complexo em relação aos pontos de corte está representado na Figura 5.

Figura 5: Distribuição do carcinoma tipo misto, carcinoma tubular e carcinoma complexo em relação aos pontos de corte.



Fonte: A autora.

Figura 5: Representação de todos os casos analisados segundo o tipo: carcinoma tipo misto (círculos rosas), carcinoma tubular (círculos verdes), carcinoma complexo (círculos azuis). O ponto central das linhas de corte é definido pela média da aplicação das funções discriminantes 1 e 2 (506,48 e -1233,21, respectivamente) de todos os casos, independentemente do tipo de tumor. Já as linhas de corte são a ligação do ponto central e um ponto entre dois tipos de tumores (centroide) definido pela aplicação das duas funções canônicas apenas para os casos destes dois tipos de tumores (misto e complexo = 506,61 e -1234,25; complexo e tubular = 505,27 e 1233,05; misto e tubular = 506,95 e 1232,60). Nessa figura, observa-se que na área de carcinoma tipo misto encontra-se um caso de carcinoma tubular classificado incorretamente, na área de carcinoma complexo, nota-se um caso de carcinoma tipo misto e um caso de carcinoma tubular classificado de forma incorreta e na área de carcinoma tubular observa-se um caso de carcinoma misto com classificação incorreta.

5 DISCUSSÃO

A estrutura nuclear é considerada um dos melhores critérios para diagnosticar os processos neoplásicos. As alterações relacionadas à estrutura do núcleo incluem modificações no tamanho e forma do núcleo, número e tamanho dos nucléolos e textura da cromatina (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004). Textura pode ser definida como uma estrutura composta de uma área contendo um número grande de elementos relativamente ordenados ou padrões (GOOL; DEWAELE; OOSTERLINCK, 1985). Baseado nestas informações, no presente trabalho foram avaliadas variáveis que caracterizam tamanho e forma do núcleo e textura da cromatina, a qual é influenciada pelo número e tamanho de regiões de heterocromatina e de nucléolos, ou seja, os “elementos ordenados”.

Inicialmente, um total de 29 variáveis foram analisadas em setenta e quatro amostras que incluíam diversos tipos de tumores de mama para verificar quais característica nucleares e cromatínicas seriam mais relevantes para determinação do prognóstico. Nessas condições, as sete primeiras características mais importantes foram as relacionadas ao tamanho e forma do núcleo (L, C, SL, FF, L/C, E, A). A oitava e nona características estão relacionadas ao pleomorfismo nuclear (DPL e DPC). Sugere-se que a alteração da forma nuclear possui um papel importante para modificações malignas, pois comumente relacionam-se à alteração na organização da heterocromatina ou perda de agregados de heterocromatina, que por sua vez, afetam o posicionamento dos genes e conseqüentemente a expressão gênica (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004).

O pleomorfismo nuclear relaciona-se a irregularidades na forma, tamanho do núcleo e alterações na quantidade e distribuição da cromatina dos núcleos (DUGGENTO et al., 2021). É um dos parâmetros analisados nos sistemas de graduação de neoplasias mamárias, junto à avaliação morfológica dos túbulos e a contagem mitótica e apresenta diferentes escores, que é determinado conforme alterações nucleares e de distribuição da cromatina (DAS; NAIR; PETER, 2020). Em geral, a variabilidade celular e nuclear representa um critério de malignidade seja na medicina humana (HUANG; BAY; TAN, 2000) ou veterinária (GOLDSCHMIDT et al., 2011) e nota-se que quanto maior a variabilidade de alterações nucleares e de cromatina, maior o grau de pleomorfismo do núcleo (DAS; NAIR; PETER, 2020).

Estudos demonstram que a textura da cromatina é o fator mais relevante

para o pleomorfismo nuclear e sugerem uma classificação baseada no padrão de cromatina aplicado a algoritmos específicos para cada escore de pleomorfismo nuclear (LEE et al., 2021). No presente estudo, entre as características relacionadas com a textura cromatínica, CoAr, CoPr e Pmr foram as mais importantes, no entanto são respectivamente a décima, décima primeira e décima segunda características mais relevantes, dentre as 29 estudadas. Isso demonstra que a forma e tamanho do núcleo e o pleomorfismo nuclear são mais importantes que a textura cromatínica para determinar o prognóstico do tumor, independentemente de seu tipo.

É sabido que a condição transcricional de um gene pode não ser determinada pela sua localização nuclear e grau de condensação, pois genes ativos podem ser encontrados na região periférica do núcleo e genes inativos no seu interior (CHERKEZYAN et al., 2014). Isso poderia justificar a menor relevância da textura cromatínica em relação ao tamanho, forma e pleomorfismo nuclear. É importante salientar que as imagens utilizadas são de cortes histológicos, ou seja, a visualização é apenas de uma fatia do núcleo, o que pode diminuir ou aumentar a eficácia da análise da textura.

Embora as alterações gênicas sejam importantes para formação de um tumor, é substancial que se conheça a organização estrutural ou morfológica do núcleo para facilitar a identificação do tipo de tumor e determinar um possível prognóstico. Por outro lado, as alterações de textura se devem possivelmente ao grau de condensação da cromatina, que corresponde à um aumento de heterocromatina quando condensada ou à diminuição quando descondensada (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004).

Esse grau de condensação pode estar associado com o potencial metastático de linhagens celulares, de modo que a condensação não é comum em células normais, pode ser induzida por diferentes tipos de células e provavelmente possui importância funcional independente de progressão do ciclo celular. Embora pouco se saiba sobre os mecanismos que afetam a estrutura cromatínica nos processos tumorais, é provável que estes estejam relacionados às modificações epigenéticas que envolvem a cromatina (ZINK; FISCHER; NICKERSON, 2004), que por sua vez, desencadeiam possíveis alterações na expressão gênica.

Mesmo utilizando 29 variáveis a precisão da função canônica gerada pela análise discriminante mostrou um erro de 35,2% quando aplicada aos mesmos 74 casos de tumores, demonstrando uma precisão relativamente baixa. Isso pode ser

explicado por terem sido utilizados oito diferentes tipos de tumores de mama, com diferentes origens, morfologia, evolução e malignidade, e consequentemente, com possíveis características morfológicas e de textura dos núcleos celulares distintas. Ou seja, era esperado que a acurácia da função discriminante fosse comprometida e que o prognóstico para um único tipo de tumor poderia melhorar a eficiência de uma função discriminante. Isso foi confirmado para os tipos de tumores misto e tubular.

Para ser realizada uma análise de discriminante canônica, o número de variáveis não pode ser maior ou igual ao número de amostras. Por isso, foram realizadas as análises de discriminante canônica separadamente para os dois tipos de tumores com maior número de casos, ou seja, tumor misto e tubular. Mesmo realizando as análises apenas destes dois tipos de tumores, houve a necessidade de diminuir a quantidade de variáveis, pois eram 24 casos (amostras) de tumor misto e 19 de tubular.

Para padronização, optou-se por utilizar o critério do valor na estrutura canônica das variáveis, sendo eliminadas aquelas com valor menor que cinco na análise com todos os tipos de tumores. Assim, restaram as 17 variáveis mais relevantes que foram utilizadas para a geração de uma função discriminante. Tanto o tumor misto como o tubular, quando analisados separadamente, obtiveram 100% de acerto quando a função discriminante foi aplicada aos mesmos tumores utilizados para sua geração.

Em relação ao tumor misto, as oito características mais relevantes para prognóstico foram L, C, SAP, E, DPC, L/C, DPL, SL. Seis dessas características (L, C, SAP, E, L/C, SL) estão diretas ou indiretamente relacionadas a forma do núcleo celular e duas (DPC, DPL) estão relacionadas ao pleomorfismo. Portanto, a forma do núcleo e sua variação são muito importantes para determinar o prognóstico deste tipo de tumor. O tamanho do núcleo tem relativa importância, visto L e C também estão relacionadas ao tamanho, assim como A, a nona característica mais relevante. A textura teria menor importância para prognóstico de tumor misto visto que só aparecem a partir da décima variável (Pmr, Amr, CoPr).

No caso de tumor tubular, os resultados foram muito semelhantes. As sete mais importantes características para o prognóstico de tumor tubular (L, C, SAP, FF, E, SL, L/C) estão relacionadas principalmente com a forma do núcleo e em menor importância, com o tamanho. A oitava e décima características estão relacionadas com o pleomorfismo nuclear e a décima primeira, décima segunda e décima terceira

características estão relacionadas com a textura cromatínica. Ou seja, as características forma, tamanho, pleomorfismo e textura da cromatina tem esta ordem de importância no prognóstico deste tipo de tumor.

E de fato, essas características possuem importância para classificação histológica, pois elas representam critérios de identificação e diferenciação dos diversos tipos de tumores mamários caninos. Por exemplo, no carcinoma tubular, o número de nucléolos pode estar relacionado ao seu tamanho, quando único apresenta-se grande e múltiplos quando pequenos; no carcinoma do tipo misto, nota-se um pleomorfismo significativo e as subpopulações celulares que apresenta difere quanto a forma celular. Já no carcinoma do tipo complexo, há duas subpopulações de células epiteliais e ambas se distinguem em relação a variação de tamanho e forma do núcleo, a epitelial maligna apresenta alterações nucleares moderada a acentuada e a mioepitelial alterações mínimas (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Diante dos resultados promissores sobre a aplicabilidade da previsão de prognóstico para tipos isolados, a análise discriminante canônica foi testada no diagnóstico diferencial de três tipos de tumores. Nesse caso, quando as funções discriminantes foram aplicadas aos casos dos três tipos de tumores avaliados (carcinoma complexo, carcinoma em tumor misto e o carcinoma tubular), houve um baixo índice de erro (18,8%), demonstrando que esta metodologia possui alta capacidade de diagnóstico diferencial entre esses tipos de tumores. Contudo, seria mais apropriado a utilização da análise morfométrica e da textura cromatínica dos núcleos celulares apenas como ferramenta complementar de diagnóstico.

A L/C, a L, o C e a E foram nessa ordem as características mais importantes para diagnóstico diferencial de acordo com ambas as estruturas canônicas. De maneira geral as características relacionadas com a forma do núcleo foram as mais relevantes para o diagnóstico diferencial. As demais características, relacionadas a tamanho, pleomorfismo e textura cromatínica, não possuem um padrão de relevância levando em consideração as duas estruturas canônicas, demonstrando serem igualmente importantes na diferenciação destes três tipos de tumores.

É importante salientar que esse estudo, partiu do pressuposto de que as amostras foram classificadas corretamente na análise histopatológica, porém como já foi relatado, há muita subjetividade neste tipo de análise. Portanto, pode ser que a acurácia da metodologia aqui testada possa ser ainda maior ou menor.

A análise de imagem computadorizada representa um método de fácil

aplicação e baixo custo e já possui aplicação, inclusive na medicina humana conforme descrito na literatura, por exemplo, para acrescentar acurácia à metodologia usual nas investigações de lesões foliculares da tireoide (FERREIRA, R. C. et al, 2009), bem como, na diferenciação de graus de glioma e para compreender o aspecto de tumor e a fisiologia das células atingidas (BORUAH; DEB, 2013, p.7). Assim, o presente trabalho mostra que a análise morfométrica e de textura cromatínica dos núcleos de células neoplásicas, possui grande potencial para auxiliar na definição prognóstica e no diagnóstico diferencial de tumores de mama em cadela.

6 CONCLUSÃO

Em geral, as características relacionadas a forma do núcleo, seguidas das características de tamanho, pleomorfismo e textura cromatínica são as mais relevantes para o prognóstico de tumores de mama de cadela. Já para o diagnóstico diferencial dos principais tipos de tumores mamários em cadelas, aquelas relacionadas a forma do núcleo também são as mais relevantes e as demais não possuem um padrão de relevância.

Embora a classificação histológica seja a mais utilizada nas rotinas laboratoriais como método de diagnóstico e prognóstico de tumor mamário caninos, a análise de imagem computadorizada da morfologia e textura cromatínica de núcleos de células neoplásicas pode ser utilizada como um método complementar para prever prognóstico e ferramenta auxiliar para diagnóstico diferencial.

REFERÊNCIAS

- ABADIE, J. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Res Treat**, [S.l.], v. 167. p. 459-468, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4542-8>
- ABDELMEGEED, S. M; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, [S.l.], v. 15. p. 8195-8205, jun. 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1601 p.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos de Biologia Celular**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 843 p.
- BELETTI, M. E.; COSTA, F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**; [S.l.], v. 85. p. 105-116, jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>
- BORUAH, D.; DEB, P. Utility of nuclear morphometry in predicting grades of diffusely infiltrating gliomas. **ISRN Oncology**, [S.l.], v. p. 1-8, ago. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/760653>
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação de câncer de mama no Brasil: síntese de dados do sistema de informação**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. p. 13-17.
- BURRAI, G. P. et al. A statistical analysis of risk factors and biological behavior in canine mammary tumors: a multicenter study. **Animals**, [S.l.], v. 10. p. 1-12, set. 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10091687>
- CANADAS, A. et al. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v. 56 (2). p. 208-219, 2019. <https://doi.org/10.1177/0300985818806968>
- CARVALHO, M. T. **Caracterização epidemiológica e histomorfológica de alterações mamárias caninas no município de Goiânia-GO**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade Federal De Goiás - Escola De Veterinária e Zootecnia. Goiânia. Goiás, 2019.
- CASSALI, et al. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Braz J Vet Pathol**, [S.l.], v. 13(3). p. 555-574, out. 2020. <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574>
- CHERKEZYAN et al. Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study. **BMC Câncer**, [S.l.], v. 189, mar. 2014 p. 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-189>

CHOCTEAU, F. et al. Proposal for a histological staging system of mammary carcinomas in dogs and cats. Part 1: canine mammary carcinomas. **Frontiers in Veterinary Science**, United States, v. 6. p. 1-12, nov. 2019. <http://doi.org/10.3389/fvets.2019.00388>

DAS, A.; NAIR, M. S.; PETER, S. D. Computer-Aided Histopathological Image Analysis Techniques for Automated Nuclear Atypia Scoring of Breast Cancer: a Review. **Journal of Digital Imaging**, [S.l.], v. 33, p. 1091-1121, jan. 2020. <http://doi.org/10.1177/s10278-019-00295-z>

DEY, P. **Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology**. India: Springer, 2018. 275 p.

DUGGENTO, A. et al. Deep computational pathology in breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, [S.l.], v. 72, p. 226-237, jul. 2021. <http://doi.org/10.1016/j.semcan.2020.08.006>

FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], v. 7. n. 4. p. 230-235, nov. 2009. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x>

FERREIRA, R. C. et al. Contribuição da análise de textura do núcleo celular para o diagnóstico de lesões foliculares da tireoide: comparação com marcadores imunohistoquímicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S.l.], v. 53/7. p. 804-810, jul. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000700003>

FISHER, E. G. Nuclear morphology and the biology of cancer cells. **Acta Cytologica**, [S.l.], v. 64. p. 511-519, jun. 2020. <http://doi.org/10.1159/000508780>

GENEVIÈVE P. D.; MOJGAN R.; JAMES R. D. Epigenetic Control. **Journal of Cellular Physiology**, [S.l.], v.219. p. 243-250, maio 2009. <http://doi.org/10.1002/jcp.21678>.

GOLDSCHMIDT, M. et al. Classification and graduation of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v.48. n.1. p.117-131, jan. 2011. <http://doi.org/10.1177/0300985810393258>

GOOL, L.V.; DEWAELE P.; OOSTERLINCK, A. Texture Analysis Anno 1983. **Computer vision, graphics, and image processing**, [S.l.], v. 29, p. 336-357, mar. 1985. [https://doi.org/10.1016/0734-189X\(85\)90130-6](https://doi.org/10.1016/0734-189X(85)90130-6)

GRAY, M. et al. Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer. **Frontiers in oncology**, [S.l.], v. 10, p.1-11, abr. 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00617>

GRUNTZIG, K. et al. Swiss canine cancer registry 1995-2008: occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumor development. **J. Comp. Path**, [S.l.], v.155, p.156-170, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.05.011>

HAKE, S. B.; XIAO, A.; ALLIS, C. D. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. **British Journal of Cancer**, [S.l.], v. 90. p. 761-769, nov. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601575>

HAMIDINEKOO, A.; ZWIGGELAAR, R. Stain Colour Normalisation to Improve Mitosis Detection on Breast Histology Images. **Lecture Notes in Computer Science**, [S.l.], v. 10553. p. 1-9, set. 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67558-9_25

HUANG, J.; BAY, B.H.; TAN, P. H. Nuclear morphology in breast cancer: is pleomorphism an illusion? **Medical Hypotheses**, [S.l.], v. 55(1), p. 26-28, jul. 2000. <https://doi.org/0.1054/mehy.1999.0980>

INGLEBERT, M et al. A living biobank of canine mammary tumor organoids as a comparative model for human breast cancer. **Scientific Reports**, [S.l.], n. 18051. v. 12. p. 1-14, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21706-2>

ISLAMI, F. et al. Proportion an number of cancer cases an death attributable to potentially modifiable risk factors in the United Satates. **Ca Cancer J Clin**, [S.l.], n. 1. v. 68. p. 31-54, jan./fev. 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21440>

JOHNSON, A. **Small animal pathology for veterinary technicians**. Johnson Wiley & Sons Inc., 2014. 226 p.

KLOPFLEISCH, R. **Veterinary Oncology**. Berlin: Springer Nature, 2016. 316p.

LEE, H.K. et al. A paradigm shift in nuclear chromatin interpretation: from qualitative intuitive recognition to quantitative texture analysus of breast cancer cell nuclei. **Cytometry Part A**, [S.l.], v. 99A, p. 698-706, 2021. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24260>

LODISH et al. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1210 p.

MONDAL, P. et al. Large animal models of breast cancer. **Frontiers in oncology**, Chigago, USA, v. 12. p. 1-9, fev. 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.788038>

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4º ed. Iwoa State Press: [S.l.], 2002. p. 575-606.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. Journal of reproduction and fertility supplement. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, [S.l.], v. 57, p. 439-443, fev. 2001. <https://www.researchgate.net/publication/11571627>

NUNES, F. C. et al. Epidemiologic, clinical and pathological evalution of overall survival in *canines* with mammary neoplasm. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, v.70, n.6, p.1714-1722, nov./dez. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10217>

- NGUYEN, F. et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Res Treat**, [S.l.], v.167, p.635-648, out. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>
- OWEN, L. N. WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. TNM - Classification of tumours in domestic animals. 5^o ed. Geneva: [S.l.], 1980. p. 16-18.
- PRABHU, S. et al. AI-based Carcinoma Detection and Classification Using Histopathological Images: A Systematic Review. **Computers in Biology and Medicine**, [S.l.], v. 142. p. 1-21, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.105209>
- PASTOR, N. et al. Prognostic significance of immunohistochemical markers and histological classification in malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, [S.l.], p. 1-10, maio 2020. <https://doi.org/10.1111/vco.12603>
- PINHO, S. S. et al. Canines tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis, [S.l.], **Translation Research**. p. 165-172, mar. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.11.005>
- RASHMI, R.; PRASAD, K.; UDUPA, C. B. Breast histopathological image analysis using image processing techniques for diagnostic purposes: a methodological review. **Journal of Medical Systems**, [S.l.], v. 46, n. 7, p. 1-24, dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10916-021-01786-9>
- RASOTTO, R. et al. Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: an observational cohort study of 229 cases. **Veterinary Pathology**, [S.l.], v. 54, n. 4. p. 571-578, jul. 2017. <https://doi.org/10.1177/0300985817698208>
- RIVERA, P. et al. Mammary Tumor development in dogs is associated with BRCA1 e BRCA2. **Cancer Res** 2009, [S.l.], v. 69 (22). p. 8770-8774, nov. 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1725>
- ROBERTSON, S. et al. Digital analysis in breast pathology – from image processing techniques to artificial intelligence. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, [S.l.], v. 194. p. 19-35, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.010>
- ROXANIS, I. et al. The significance of tumour microarchitectural features in breast cancer prognosis: a digital image analysis. **Breast Cancer Research**, [S.l.], n. 20, v. 11, p. 1-11, fev. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0934-x>
- ROWELL, J. L.; MCCARTHY, D. O.; ALVAREZ, C. E. Dog models of naturally occurring cancer. **Trends in molecular medicine**, [S.l.], v. 17. n. 7. p. 380-388, jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.02.004>
- SANTOS, M. K. et al. Inteligência artificial, aprendizado de máquina, diagnóstico auxiliado por computador e radiômica: avanços da imagem rumo à medicina de

precisão. **Radiologia Brasileira**, [S.l.], v. 6, n. 52, p. 387-396, nov./dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2019.0049>

SILVER, I. A. The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. In: SYMPOSIUM ON MAMMARY NEOPLASIA IN GLAND OF DOG AND CAT. 9^o Congress Anual BSAVA, 1966, London, [S.l.:sn] [1966]. p. 689-696. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1966.tb04394.x>

SORENMO, K. U et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, [S.l.] v. 48. p. 85-97, 2011. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>

SILVA, T. C. **Análise dos tipos histológicos do câncer de mama em cadelas e sua correlação com o perfil de expressão de proteínas associadas ao prognóstico**. 2018. Dissertação (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca Cancer J Clin**, [S.l.], n.3. v. 71. p. 209-249, maio/jun. 2021. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

VARALLO, G. et al. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. **Oncology Letters**, [S.l.], v. 18, p. 6545-6553, dez 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11052>

VETA, M. et al. Breast câncer histopathology image analysis: a review. **IEEE transactions on bio-medical engineering**, [S.l.], v. 61, n. 5. p. 1400-1411, maio 2014. <https://doi.org/10.1109/TBME.2014.2303852>

ZINK, D.; FISCHER, A. H.; NICKERSON, J.A. Nuclear structure in cancer cells. **Nature Reviews/Cancer**, [S.l.], v. 4, p. 677-687, set 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1430>

WALDEMARIN, K. C. A; BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. Nuclear morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. **Real-Time Imaging**, [S.l.], v.10. p.197-204, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.rti.2004.05.003>

WALDEMARIN, K. C. A. **Morfometria do núcleo de células neoplásicas como método de diagnóstico de histiocitoma, mastocitoma e tumor venéreo transmissível em cães**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Medicina Veterinária. Uberlândia. Minas Gerais, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Classificação histológica dos tumores mamários caninos segundo Goldschmidt (2011).

NEOPLASIAS EPITELIAIS MALIGNAS	• Carcinoma in situ • Carcinoma simples ✓ Tubular ✓ Túbulo-papilar ✓ Papilar-cístico ✓ Cribriforme • Carcinoma micropapilar invasivo • Carcinoma sólido • Comedocarcinoma • Carcinoma anaplásico • Carcinoma oriundo de um complexo adenoma/tumor misto • Carcinoma complexo • Carcinoma e mioepitelioma maligno • Carcinoma misto • Carcinoma ductal – equivalente maligno do adenoma ductal • Carcinoma papilar intraductal
NEOPLASIAS EPITELIAIS MALIGNAS – TIPOS ESPECIAIS	• Carcinoma de células escamosas • Carcinoma adenoescamoso • Carcinoma mucinoso • Carcinoma rico em lipídio • Carcinoma com células de morfologia fusiforme ✓ Mioepitelioma maligno ✓ Carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes ✓ Carcinoma – variante de células fusiformes

	• Carcinoma inflamatório
NEOPLASIAS MESENQUIMAIS MALIGNAS - SARCOMAS	• Osteossarcoma • Condrossarcoma • Fibrossarcoma • Hemangiossarcoma • Outros sarcomas
CARCINOSSARCOMA	• Tumor mamário misto maligno
NEOPLASIAS BENIGNAS	• Adenoma simples • Adenoma papilar intraductal • Adenoma ductal ✓ Com diferenciação escamosa • Fibroadenoma • Mioepitelioma • Adenoma Complexo • Tumor misto benigno
LESÕES HIPERPLÁSICAS E DISPLÁSICAS	• Ectasia ductal • Hiperplasia Lobular (Adenose) ✓ Regular ✓ Com atividade secretória ✓ Com fibrose – Tecido conjuntivo fibroso interlobular ✓ Com atipia • Epiteliose • Papilomatose • Alteração Fibroadenomatosa • Ginecomastia
NEOPLASIAS DO MAMILO	• Adenoma • Carcinoma • Carcinoma com infiltração epidérmica
HIPERPLASIA E DISPLASIA DO MAMILO	• Melanose da pele do mamilo

Fonte: Modificado (Goldschmidt et al., 2011).

ANEXO B - Predição prognóstica conforme evolução dos casos analisados.

CASO ANALISADO	TIPO DE TUMOR	ÓBITO POR TUMOR	EVOLUÇÃO
23306	Carcinoma Sólido	Sim	Desfavorável
23466	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
23496	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
23516	Carcinoma em Tumor Misto	Sim	Desfavorável
23564	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
23616	Carcinoma Complexo	Não	Favorável
23640	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
23649	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
23657	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
23663	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
23686	Carcinoma Complexo	Não	Favorável
23689	Carcinoma Sólido	Sim	Desfavorável
23752	Carcinoma Tubulopapilar	Sim	Desfavorável
23764	Carcinoma Sólido	Sim	Desfavorável
23818	Carcinoma Papilar	Não	Favorável
23842	Carcinoma Tubular Cístico	Sim	Desfavorável
23849	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
23865	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
23908	Carcinoma Sólido	Não	Favorável
23929	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
23972	Carcinoma Complexo	Não	Favorável
23973	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
24015	Carcinoma Tubulopapilar	Não	Favorável
24033	Carcinoma em Tumor Misto	Sim	Desfavorável
24034	Carcinoma Tubulopapilar	Sim	Desfavorável
24052	Carcinoma Tubulopapilar	Não	Favorável
24061	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
24099	Carcinoma Papilar	Não	Favorável
24104	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24178	Carcinoma Papilar	Não	Favorável

24234	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24239	Carcinoma Sólido	Sim	Desfavorável
24256	Carcinoma Complexo	Não	Favorável
24268	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24274	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24462	Carcinoma Tubulopapilar	Não	Favorável
24488	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24490	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24500	Carcinoma em tumor Misto	Não	Favorável
24555	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
24638	Carcinoma Tubulopapilar	Sim	Desfavorável
24658	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
24670	Carcinoma em Tumor Misto	Sim	Desfavorável
24726	Carcinoma em Tumor Misto	Sim	Desfavorável
24776	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24777	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
24830	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
24858	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24891	Carcinoma Complexo	Não	Favorável
24909	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
24954	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
24960	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25087	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25095	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25141	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25162	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25171	Carcinoma Micropapilar Invasor	Sim	Desfavorável
25186	Carcinoma Tubular Cístico	Sim	Desfavorável
25196	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
25239	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25260	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
25302	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25362	Carcinoma Tubulopapilar	Sim	Desfavorável

25421	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25442	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25462	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
25465	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25466	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25648	Carcinoma Tubular	Sim	Desfavorável
25715	Carcinoma em Tumor Misto	Não	Favorável
25745	Carcinoma Tubular	Não	Favorável
25834	Carcinoma Complexo	Sim	Desfavorável
25836	Carcinoma Papilar	Não	Favorável
26048	Carcinoma Tubular	Não	Favorável

Fonte: A autora.