

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO E DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-
INFLAMATÓRIAS NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS**

Eduardo Garrido

Médico Veterinário

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO E DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-
INFLAMATÓRIAS NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS**

Eduardo Garrido

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Patologia Animal.

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS

AUTOR: EDUARDO GARRIDO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. CLAUDIA MOMO
Universidade de São Paulo / São Paulo/SP

Prof. Dr. KAREN REGINA LEMOS
Universidade do Centro-Oeste / Guarapuava/PR

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 10 de abril de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

EDUARDO GARRIDO, nascido em 23 de setembro de 1974 em São Paulo, formou-se em Medicina Veterinária em 2006 pelo Centro Universitário “Barão de Mauá” e fez parte do Programa de Iniciação Científica e monitoria daquela instituição. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Patologia Veterinária do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel-FCAV – UNESP, no período de 2007 a 2009. Foi discente do programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV – UNESP, no curso de Mestrado em Patologia Animal de 2009 a 2011. Desde 2011 é discente do curso de Doutorado da mesma instituição. Membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária desde 2007 e do Corpo Editorial de seu Boletim desde setembro de 2009. Desde 2014 é docente no conjunto de disciplinas Patologia Veterinária, Anatomia Patológica, Patologia Clínica e Toxicologia Veterinária do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) – Campus de Salinas.

A cisterna contém, afonte derrama.

William Blake

**Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Salete (*in memoriam*), pelo apoio,
carinho e amor que sempre me dedicaram.**

**À Thaís Larissa Lourenço Castanheira, pelo companheirismo, cumplicidade e
conhecimento que me oferta.**

À Sofia, sem a qual nada disso teria acontecido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pela orientação altruísta, paciente e precisa, sem a qualeste trabalho seria impossível.

Agradeço à MSc. Thaís Larissa Lourenço Castanheira pela dedicação, paciência e apoio técnico e intelectual.

Agradeço à doutoranda Mayara Rosolem, pela ajuda, companheirismo e apoio.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo 2012/09385-0) e concessão da bolsa de doutorado (Processo 2011/13896-7).

Agradeço ao serviço de Obstetrícia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, na figura do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, pela disponibilização do espaço para as colheitas de material, bem como, ao Serviço de Oncologia Veterinária pelas amostras de tumor de mama canino utilizadas neste estudo.

SUMÁRIO

Protocolo da comissão de ética no uso de animais.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Lista de Abreviaturas.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
5. RESULTADOS.....	23
6.DISSCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 005925/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Imunodeteção de Tbet, GATA-3 e células T regulatórias em tumores mamários de cadelas**", sob a responsabilidade da Profª Drª Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de Abril de 2013.

Jaboticabal, 11 de Abril de 2013.


Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi
Coordenador - CEUA

CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS

RESUMO- A inflamação é um componente crítico para a progressão de tumores e sua malignidade está correlacionada com a resposta inflamatória induzida por citocinas e leucócitos infiltrados no sítio tumoral. O presente estudo teve por objetivo caracterizar, por imuno-histoquímica, o infiltrado inflamatório e citocinas pró e anti-inflamatórias nos carcinomas mamários caninos e determinar a identidade molecular dos tumores em luminal A ou B, C-erbb-2 ou basal. Para isso fez-se a imunodeteção de macrófagos, linfócitos (CD4, CD8, Treg), citocinas (MIF, IL-10, IL-4 e TGF- β e IFN- γ), além de C-erbb-2, receptor de estrógeno e receptor de progesterona e avaliou-se as médias das imunomarcações por meio do Teste T e análise de variância nos tecidos mamários com ou sem carcinomas. Houve diferença estatística ($p < 0,0001$) entre o grupo controle e o grupo de animais com carcinoma mamário simples em todos os parâmetros avaliados, apresentando aumento nas médias de animais acometidos por neoplasias. Quando ocorreu a divisão por tipo histológico, todos os anticorpos apresentaram diferença com o grupo controle ($p < 0,0001$). Os carcinomas mamários simples (tubulares e papilares) apresentaram aumento na contagem de macrófagos, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, T regulatórios, assim como, aumento na imunomarcação das citocinas MIF, IL-10, IL-4 e TGF- β em comparação ao grupo controle. Os carcinomas mamários sólidos tiveram menor detecção de macrófagos e das subpopulações de linfócitos T, bem como de IFN- γ , IL-4 e TGF- β , possivelmente por um menor estímulo do sistema imune como mecanismo de evasão. Os macrófagos e linfócitos T CD4, bem como a citocina IL-10 foram predominantes no padrão tubular. Os carcinomas mamários caninos apresentam um perfil celular e de citocinas com ação pró-tumor, favorecendo seu crescimento e metástase. Na identificação molecular os tumores basais apresentaram menor imunomarcação para CTLs e IL-4.

Palavras chaves: Cão, evasão tumoral, neoplasia mamária e resposta imune

**IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY CELLS AND
PRO AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN CANINES BREAST
CARCINOMAS**

ABSTRACT- Inflammation is a critical component of tumor progression and its malignancy is correlated with the inflammatory response induced by cytokines and infiltrating leukocytes in the tumor site. This study aimed to characterize, by immunohistochemistry, the inflammatory infiltrate and pro- and anti-inflammatory cytokines in canine mammary carcinomas and determine the molecular identity of tumors in luminal A or B, C-erbB-2 or basal. For this, we made immunodetection of macrophages, lymphocytes (CD4, CD8, Treg), cytokines (MIF, IL-10, IL-4 and TGF- β and IFN- γ), further on c-erbB-2, estrogen receptor and progesterone receptor and evaluated the average of immunostainings through the T test and analysis of variance in the breast tissue with or without carcinomas. There was statistical difference ($p < 0.0001$) between the control group and the group of animals with simple breast carcinoma in all parameters, an increase in average animal affected by cancer. When the split occurred by histological type, all antibodies showed differences with the control group ($p < 0.0001$). Simple breast carcinoma (papillary and tubular) showed increased macrophage counts, T lymphocytes, T helper lymphocytes, regulatory T as well as increase in the immunostaining of the cytokines MIF, IL-10, IL-4 and TGF- β compared to control group. The solid breast carcinomas have had a decreased of macrophages and subsets of T lymphocytes and IFN- γ , IL-4 and TGF- β , possibly for less stimulation of the immune system as evasion mechanism. The macrophages and T CD4 + lymphocytes and IL-10 cytokine were prevalent in the tubular pattern. The canine mammary carcinomas have a cell profile and cytokines with pro-tumor action, favoring their growth and metastasis. In the basal molecular identification tumors has lower immunostaining of CTLs and IL-4.

Keywords: Breast cancer, dog, immune response and tumor evasion

Índice de Tabelas

Tabela	Título	Página
1	Identificação dos anticorpos, marca, código, espécie de origem, diluição, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, anticorpo secundário, utilizados no experimento.....	18
2	Frequência de padrões histológicos dos carcinomas simples observados nas mamas caninas com tumor, Jaboticabal, SP, março de 2011 a março de 2014.....	20
3	Frequência de padrões moleculares dos carcinomas simples observados nas mamas caninas, Jaboticabal, SP, março de 2011 a março de 2014.....	32
4	Quantidade de tumores mamários segundo sua identidade molecular e seu tipo histológico utilizados no experimento.....	35

Índice de Figuras

Figura	Título	Página
1	Fotomicrografias de carcinoma mamário canino, padrão sólido. A) Notar imunomarcção para macrófagos (setas). B) Notar células imunomarcadas (setas) para MIF em leucócitos. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Objetiva de 40x. Complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase (LSAB). Objetiva de 40x.....	24
2	Média de imunomarcção para os anticorpos anti-Calproteína (macrófago) e anti-MIF. Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%.....	24
3	Média de imunomarcção para os anticorpos anti-Calproteína (macrófago) e anti-MIF. Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%..	25
4	Fotomicrografias de carcinomas tubulares mamários caninos. A) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-CD3 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. B) Imunomarcção para o anticorpo anti-CD4 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. C) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-CD8 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. D) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-FoxP3 (setas / detalhe). Complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase (LSAB). Obj. 10x, no detalhe 40x.....	26
5	Média de imunomarcção para os anticorpos anti-CD3, CD4, CD8 e FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%.....	27
6	Média de imunomarcção para os anticorpos anti-CD3, CD4, CD8 e FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%...	28

- 7 Fotomicrografias de tumores mamários caninos. A) Carcinoma padrão sólido evidenciando área de células imunomarcadas para o anticorpo anti-IFN- γ (setas / Obj. 20x) B) Carcinoma padrão tubular evidenciando imunomarcação do anticorpo anti IL-10 (setas / Obj 20x) C) Carcinoma padrão tubular evidenciando imunomarcação no tecido para o anticorpo anti IL-4 (setas / Obj. 40x). D) Carcinoma padrão papilar evidenciando área de células imunomarcadas para o anticorpo anti-TGF- β (elipse). No detalhe células imunomarcadas para TGF- β (setas / Obj. 10x, no detalhe 20x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP)..... 29
- 8 Média de imunomarcação para os anticorpos anti-IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%..... 30
- 9 Média de imunomarcação para os anticorpos anti-IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%..... 31
- 10 Fotomicrografia de tumor mamários caninos. A, C e E) Tumores apresentando imunomarcação positiva para o anticorpo anti-RE, Anti RP e anti C-erbb-2, respectivamente. Notar marcação intranuclear. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 20x. B, D e F) Tumores apresentando imunomarcação negativa para os anticorpo anti-RE, anti-RP e anti Cerbb-2. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 10x..... 33
- 11 Média de imunomarcação para os anticorpos anti-Calprotecnina (macrófagos), CD3, CD4, CD8 E FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos segundo os subtipos moleculares dos tumores mamários. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os teste de SNK ou KW, com nível de significância de 5%. Apenas o anticorpo que apresenta diferença (CD8) está marcado com letras..... 34
- 12 Média de imunomarcação para os anticorpos MIF, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos segundo os subtipos moleculares

dos tumores mamários. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os teste de SNK ou KW, com nível de significância de 5%. Apenas o anticorpo que apresenta diferença (IL-4) está marcado com letras.....

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
DC	Células dendríticas
COX-2	Receptor de ciclo-oxigenase-2
CTL	Linfócito T citotóxico
FoxP3	Fator de transcrição de linfócitos T regulatórios
GC	Grupo controle
GCP	Grupo de carcinomas papilares
GCS	Grupo de carcinomas sólidos
GCT	Grupo de carcinomas tubulares
GT	Grupo de animais acometidos por tumores mamários
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
KW	Kruskal-Wallis
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo2
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIF	Fator de inibição de migração de macrófagos
MWW	Teste de Mann-Whitney-Wilcoxon
NK	CélulasExterminadoras naturais
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SI	Sistema Imune
SNK	Teste de Student Newman Keuls
T CD4	Linfócitos T auxiliares
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	Linfócito auxiliar 1
Th2	Linfócito auxiliar 2
TM	Tumores mamários
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulatório
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

1.INTRODUÇÃO

A inflamação desempenha importante papel na progressão das neoplasias, tanto em humanos como em animais. Vários estudos em humanos destacam a importância da resposta inflamatória contra as células neoplásicas e a correlação clínica com o valor prognóstico e de malignidade.

A resposta imune antitumoral eficiente caracteriza-se pela ativação da resposta imune celular e por um perfil de citocinas pró-inflamatórias, que irão controlar o crescimento do tumor. No entanto, nas neoplasias malignas a ativação deste tipo de resposta não é eficiente por vários fatores. Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa com tumores mamários caninos, verifica-se que as células dendríticas, que são essenciais na ativação da resposta imune contra as células tumorais, apresentavam falhas na sua maturação e, portanto, não exerceram uma eficiente ativação de linfócitos T, refletindo no perfil de citocinas produzidas no microambiente tumoral. Da mesma forma observou-se que os macrófagos e linfócitos associados aos tumores eram mais numerosos nos tumores mais agressivos. Demonstrou-se ainda que a expressão de citocinas, como a IL-4 e IL-10, apresenta relação direta com a malignidade dos tumores mamários.

Estudos com enfoque nas respostas inflamatórias induzidas por linfócitos T auxiliares, citotóxicos e regulatórios e sua relação com o perfil de citocinas produzidas nos carcinomas mamários simples caninos podem permitir um melhor entendimento do desenvolvimento tumoral. A partir disso, mais investigações podem ser feitas com

o objetivo de determinar condutas terapêuticas mais eficientes, como a modulação da resposta imune e a utilização de terapias humorais.

A determinação de marcadores de prognóstico na imunomarcção de determinados receptores estrogênicos (Estrógeno e Progesterona) e do marcador C-erbB-2, fornecendo uma identificação molecular das neoplasias mamárias pode trazer novas estratégias de tratamento e determinar o prognóstico das neoplasias mamárias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As neoplasias mamárias representam aproximadamente 50% de todas as neoplasias em cães (KUMARAGURUPARAN et al., 2006a; KENNEDY; MILLER, 1993), sendo que as de caráter maligno representam cerca de 40 a 50% (SARLI et al., 2002). Os tumores mamários de origem epitelial (tipo simples) são os mais comuns e sua etiologia é multifatorial (KUMARAGURUPARAN et al., 2006b).

Os carcinomas simples são relativamente frequentes em cães, sendo o padrão tubular predominante. O carcinoma tubular é caracterizado pela proliferação epitelial arranjada em uma forma predominantemente tubular. A quantidade de estroma pode variar consideravelmente. Estes tumores têm uma forte tendência a infiltrar tecidos e vasos circundantes. A infiltração linfocítica do tumor é frequente, em aproximadamente 50% dos casos e focos de necrose são frequentes (CASSALI et al., 2014; BABA; CÂTOI, 2007).

Carcinomas papilares são tumores histologicamente caracterizados por proliferação epitelial papila rarborecente, com estroma fibrovascular central, com células geralmente bem diferenciadas, com um baixo a moderado grau histológico e moderada atividade mitótica e pleomorfismo. Os tumores com áreas tubulares e papilares não são raros. Quando carcinomas exibem mais de 60% de áreas tubulares são classificados como tubular, se exibem mais de 60% de áreas papilares eles são considerados papilares (CASSALI et al., 2014; BABA; CÂTOI, 2007).

O carcinoma sólido é um tipo comum de tumor mamário em cães, sendo que o carcinoma sólido é provavelmente uma forma mais avançada de outros tipos de

carcinoma, sendo muitas vezes observado quando os tumores se desenvolvem por longos períodos de tempo sem intervenção cirúrgica. Microscopicamente, existe proliferação de células epiteliais organizados numa disposição sólida, células tumorais indiferenciadas, com núcleos pequenos e hipercromáticos, índice mitótico e pleomorfismo elevados e a presença de um infiltrado linfoplasmocitário de moderado a intenso (CASSALI et al., 2014; BABA; CÂTOI, 2007).

O prognóstico das neoplasias mamárias malignas está associado ao tamanho do tumor primário, com a classificação histológica e com a expressão de oncogenes (HELLER et al., 2005). A invasão do estroma por células neoplásicas e a presença de êmbolos neoplásicos em vasos também são aspectos relevantes (SARLI et al., 2002). O tipo e intensidade do infiltrado inflamatório no carcinoma tumoral também apresenta valor prognóstico importante (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

A inflamação é um componente crítico para o desenvolvimento tumoral, haja vista que muitos tumores surgem em locais de infecção ou inflamação crônica. O papel da inflamação crônica na carcinogênese foi proposto por Rudolf Virchow em 1863, ao observar a presença de leucócitos em tecidos tumorais. Virchow postulou que um meio inflamatório promove um ambiente celular que orienta a iniciação e o desenvolvimento tumoral (CARVALHO et al., 2014).

A imunologia tumoral baseia-se em dois mecanismos importantes, a imunovigilância e a evasão do sistema imune (SI). A imunovigilância envolve mecanismos de destruição das células tumorais, tanto pela ação da imunidade inata, mediada por macrófagos e células exterminadoras naturais (NK), quanto pela adquirida, mediada por linfócitos T, que desencadeiam uma resposta imune celular

(ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012). A evasão do SI permite às células neoplásicas criarem um ambiente de tolerância, levando ao crescimento e à malignidade tumoral por meio de uma variedade de mecanismos que incluem a produção de citocinas imunossupressoras e alterações nas funções de células dendríticas (DC) (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ODA et al., 2008; SATYAM et al., 2011). Reome et al. (2004) afirma que a malignidade dos tumores mamários (TM) pode estar relacionada com a resposta inflamatória induzida por linfócitos e outras células inflamatórias infiltradas no sítio de crescimento tumoral.

2.1 Macrófagos

É amplamente reconhecido que os macrófagos associados ao tumor (TAM) representam um importante componente do infiltrado leucocitário na maioria das neoplasias malignas. Os TAMs dão suporte ao crescimento tumoral pela secreção de citocinas, que promovem a proliferação e a angiogênese, e de metaloproteinases, que possibilitam a invasão e formação de metástase para sítios distantes. Os TAMs ainda inibem a atividade de linfócitos no sítio tumoral pela produção de citocinas imunossupressoras como a Interleucina 10 (IL-10) e pela produção de prostanóides. Em decorrência disso, os macrófagos não apenas falham na eliminação de células tumorais como podem, ainda, contribuir para a progressão tumoral (HAGEMANN et al., 2005). Isso se deve ao fato de haver dois fenótipos distintos de macrófagos, apresentando ação anti ou pró-tumoral.

Os macrófagos do tipo 1 (M1) se comportam como macrófagos apresentadores de antígenos, com ação citotóxica por meio de espécies reativas de oxigênio e são

potentes células antitumorais (SICA et al., 2008). Eles são ativados pela via clássica, por meio da ação de citocinas, como o interferon gama (IFN- γ), e apresentam complexos principais de histocompatibilidade (MHC) do tipo I e II, mas tem um predomínio de resposta do tipo I (GORDON, 2003; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005).

Os Macrófagos do tipo 2 (M2), por estarem fortemente associados à angiogênese e ao remodelamento da matriz extracelular (MEC), apresentam ação pró-tumoral e estão relacionados ao crescimento do tumor (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; SICA et al., 2008; HAO et al., 2012). Os M2 são ativados pela via alternativa, constituída por várias citocinas, tais como a interleucina 4 (IL-4) e a IL-10 (GORDON, 2003).

A hipóxia tecidual decorrente do crescimento tumoral induz os TAMs a produzirem diversos fatores angiogênicos, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), além de proteases extracelulares como as metaloproteinases 1, 2, 3, 9 e 12, a plasmina e a uroquinase ativadora de plasminogênio (SIVEEN; KUTTAN, 2009).

A manutenção dos TAMs no sítio tumoral pode ser influenciada por citocinas, entre as quais, o fator de inibição de migração dos macrófagos (MIF), uma citocina pleiotrópica e reguladora positiva da imunidade do hospedeiro que promove a resposta inflamatória celular. O MIF é um mediador importante da ativação de macrófagos pela via alternativa, isto é, macrófagos do tipo 2, e na expressão de fatores pró-angiogênicos. O MIF ainda suprime ativamente as respostas dos linfócitos

antitumorais e pode aumentar as taxas de produção de metaloproteinases de macrófagos, facilitando a invasão de células tumorais (YADDANAPUDI et al. (2013); VERJANS et al., 2009; HAGEMANN et al., 2005). Lo et al. (2013) demonstraram que o MIF está associado à angiogênese e à implantação de metástases em linfonodos ocasionados por carcinomas nasofaríngeos em humanos e contribui para a proliferação celular e a tumorigênese. O MIF não é secretado apenas por células imunes, mas também por células tumorais sob estímulo inflamatório ou de estresse (VERJANS et al., 2009; ARMSTRONG et al., 2008).

Estudos demonstram que há relação entre a secreção de MIF, a agressividade e o potencial metastático de tumores, sugerindo uma importante contribuição de MIF para a malignidade do tumor (ODA et al., 2008). Segundo Verjans et al. (2009), MIF tem sua secreção aumentada em vários tipos celulares no tecido mamário neoplásico humano, mas seu papel funcional na patogênese deste tumor continua pouco entendida.

2.2 Linfócitos T citotóxicos (CD8), T auxiliares (CD4) e regulatórios

Os linfócitos T (CD3) secretam várias citocinas, as quais apresentam importante papel na resposta antitumoral, promovendo uma resposta imune longa e duradoura contra as células tumorais (HORIUCHI, et al., 2007; CHIKAMATSU et al., 2008).

Os linfócitos T podem diferenciar-se em linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) ou T auxiliares CD4 (T CD4). Os CTL podem reconhecer e eliminar as células tumorais

que expressem peptídeos apresentados por receptores do tipo MHC I, liberando grânulos de ação citotóxica e secretando IFN- γ (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012; CHIKAMATSU et al., 2008; HORIUCHI et al., 2007). As barreiras que impedem o reconhecimento do tumor pelas CTLs incluem vários mecanismos, tais como o sequestro de antígenos associados aos tumores e do MHC, perda de moléculas co-estimulatórias e outras moléculas necessárias à ativação dos CTLs (CARVALHO et al. 2014).

Os linfócitos T auxiliares CD4⁺ subdividem-se em linfócitos auxiliares 1 (Th1) e linfócitos auxiliares 2 (Th2), cada qual com um perfil de citocinas específicas, responsáveis pelo equilíbrio imune do organismo. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ , interleucina 2 (IL-2) e TNF- α . Os linfócitos Th2 produzem interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). Funcionalmente, o linfócito Th1 desenvolve uma resposta imune celular com ação antitumoral, enquanto que o Th2 desenvolve uma resposta imune humoral, com ação pró-tumoral. A proporção balanceada na resposta imune deve-se a uma retroalimentação negativa equilibrada. Para tanto, o IFN- γ possui um efeito supressor sobre as citocinas dos linfócitos Th2, enquanto a IL-4 e a IL-10 suprimem as citocinas dos linfócitos Th1 (REED, 1995; YAMAZAKI et al., 2002; HORIUCHI, et al., 2007).

A liberação e função destas citocinas são reguladas por outras citocinas e fatores de transcrição. Em alguns estudos, sugere-se que as neoplasias malignas possam suprimir a resposta antitumoral dos linfócitos Th1 nos tecidos e na circulação. A tendência à formação de linfócitos Th2 na resposta imune ao câncer tem um papel

importante na imunossupressão tumoral e, ocasionalmente, interfere no sucesso terapêutico (SATYAM et al., 2011).

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) são um constituinte particular da população de linfócitos T auxiliares CD4, que modulam os efeitos do sistema imune, inibindo a atividade de outros linfócitos T auxiliares, CTLs, linfócitos B e células exterminadoras naturais (NK) (RISSETO et al., 2010). Esses efeitos supressivos são mediados por citocinas imunossupressoras como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e a IL-10 ou pelo contato direto entre as células (BILLER et al., 2007; O'NEILL et al., 2009). Os linfócitos Treg contribuem significativamente para a ativação de linfócitos Th2 e para a supressão de Th1 em pacientes com tumores (BOSE et al. 2009; SATYAM et al., 2011). Sob a influência de IL-4, as células tumorais aumentam a regulação da expressão de IL-10 e a diminuição da função das células NK, colaborando com a sobrevivência, o crescimento e a metástase nas neoplasias malignas (SATYAM, et al., 2011).

No organismo hígido, as Tregs desenvolvem um papel crítico na prevenção de doenças autoimunes, na manutenção da tolerância periférica (BILLER et al., 2007) e limitam a resposta imune aos patógenos (SUFFNER et al., 2010). No paciente com câncer há evidências de que as Tregs possam ser induzidas também pela neoplasia e suprimam a resposta imune aos antígenos tumorais (STANDISH et al., 2008). Como em outros pacientes oncológicos, os pacientes com tumores mamários apresentam um aumento no número de Tregs na circulação sanguínea e no sítio tumoral primário. Este aumento relaciona-se significativamente com a malignidade da neoplasia, coma

amplificação do oncogene C-*erbB-2*[um receptor de membrana tirosina quinase, com função de fator de proliferação, também conhecido como receptor 2 proto-oncogênico do fator de proliferação epidermal humano (*Her2/neu*)], além da perda de expressão de receptores para estrógeno (RE) e para progesterona (RP) (MÉNÉTRIER-CAUX et al., 2009).

O aumento no número de Tregs no sítio tumoral pode ser induzido por altas concentrações de TGF- β , produzido pelo próprio tumor (O'NEILL et al., 2009). Assim como em humanos, em cães verificou-se um aumento na população de Tregs em vários tipos de tumores e, também verificou-se que a porcentagem de Tregs em tumores metastáticos caninos é significativamente maior que naqueles que não apresentam metástases (HORIUCHI et al., 2009).

As células Treg naturais expressam CD4 e CD25 em sua membrana e também o fator de transcrição FoxP3 (O'NEILL et al., 2009). Os linfócitos Tregs caninos induzidos por contato (CD4⁺ CD25⁻), assim como os humanos, falham em obter a expressão de FoxP3, estando esta expressão limitada aos linfócitos T com fenótipo regulatório nativo, por isso, a expressão de FoxP3 é atualmente o melhor método de quantificar as Tregs naturais em cães (BILLER et al., 2007). O FoxP3 é uma proteína, membro da família FOX de reguladores de transcrição, envolvida na regulação do desenvolvimento e da funcionalidade do sistema imune. Esta proteína desempenha um papel crucial na geração de Tregs e a perda da sua transcrição leva ao decréscimo destas células, resultando em linfoproliferação autoimune fatal, enquanto

que a expressão exacerbada de FoxP3 gera uma imunodeficiência grave (MERLO et al., 2009).

2.3 Citocinas

O IFN- γ é uma citocina conhecida por ativar linfócitos Th1 e células NK, sendo produzida em resposta à presença de tumores. O IFN- γ age também diretamente sobre DCs para promover a sua maturação, evitar a redução de sua atividade e aumentar a atividade de supressão ao crescimento tumoral. Assim, a imunidade contra os tumores pode ser eficientemente aumentada para melhorar a resposta clínica, desde que o IFN- γ seja mantido em um ambiente rico em DCs (MITO et al., 2010). Entretanto, o IFN- γ está normalmente suprimido durante o desenvolvimento tumoral, pois é a principal citocina de ativação do perfil Th1 e importante para a ação antitumoral (REOME et al., 2004). O IFN- γ pode ativar o STAT-1, desencadeando uma resposta pró-tumoral, sendo um mecanismo de evasão tumoral ainda não totalmente elucidado, mas que parece estar relacionado com uma fase tardia do desenvolvimento neoplásico mamário, pela mobilização de células supressoras derivadas do tecido mieloide e a inibição de linfócitos T (PEROU et al., 1999; HIX et al., 2013).

A IL-10 desenvolve importante papel na inibição da ativação de macrófagos, limitando a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α . Inibe a ativação antígeno específica dos linfócitos T, pela regulação negativa das células apresentadoras de antígenos, inibindo a expansão de linfócitos T, pela inibição da produção de IL-2. A sua produção

aumenta a expressão de MHC-II em linfócitos B e inativa a resposta Th1, principalmente pela inibição da produção do IFN- γ . A IL-10 também inibe a liberação de citocinas, a partir de macrófagos e, estimula a multiplicação de mastócitos (HODI; SOIFFER, 2002). Atua ainda promovendo efeitos supressivos sobre a ação dos linfócitos T CD4, por meio da formação de Tregs (BILLER et al., 2007; O'NEILL et al., 2009).

A IL-4 é a principal citocina sinalizadora para uma resposta do tipo Th2 (REED, 1995; SATYAM et al., 2009). O aumento da expressão de IL-4 relaciona-se com a ativação e manutenção de macrófagos do tipo M2 no sítio tumoral, auxilia a progressão do tumor e está associado à malignidade tumoral, segundo estudos de Reome et al. (2004) e Satyam et al. (2009). As células epiteliais neoplásicas também são capazes de secretar IL-4 (ZHANG et al., 2008), sugerindo efeitos parácrinos em outras células, aumentando a secreção de citocinas Th2.

O TGF- β atua sobre os macrófagos, polarizando-os para um fenótipo tipo M2, inibe a atividade das células NK, estimula a diferenciação das células T CD4⁺ em Th2, inibindo a atividade dos CTL e estimulando a diferenciação das células T em Tregs, possuindo, portanto, um caráter imunossupressor sobre a resposta inata, assim como na adquirida (HAO et al., 2012).

2.4 Identidade molecular por imunomarcção dos receptores para estrógeno e progesterona e de C-erbb-2.

Os REs e os RPs têm sido utilizados desde dos anos 1970 no manejo clínico de TM humanos como um indicador da resposta endócrina e como fator prognóstico para a recidiva precoce. A presença de RPs tem grande valor preditivo para os pacientes humanos com TM, indicando uma melhor resposta ao tratamento (BARDOU et al., 2003).

As vias de sinalização estrogênicas estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de tumores da mama por meio da ativação do receptor de estrógeno. As células da maioria dos cânceres de mama expressam altos níveis de RE e exibem uma proliferação celular estrógeno dependente. Os REs participam da regulação de diversos eventos celulares, incluindo o crescimento celular e a apoptose, atuando como fator de transcrição de ativação da expressão de genes alvo (IJICHI et al., 2011).

O C-erbb-2 é uma proteína membro da família das tirosinas quinases que ligam o fator de crescimento epidérmico e outras moléculas assemelhadas e são fundamentais para o desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas e, quando ativos, unem-se em dímeros, se transfosforilam, e passam a ser capazes de transduzir sinais intracelulares, afetando o crescimento celular, inibindo a apoptose, a migração, a invasividade e a angiogênese, levando à progressão de tumores malignos (FREITAS, 2008). Em humanos, alterações na expressão de C-erbb-2 contribuem para a tumorigênese dos cânceres de mama. Pacientes exibindo superexpressão de C-erbb-2 tendem a ter menor tempo de remissão, menor tempo de sobrevivência e, geralmente, um prognóstico ruim. Em oposição, cães com TM C-erbb-2 positivos tinham mais tempo de sobrevivência global o que cães C-erbb-2

negativos. As razões para a diferença da superexpressão de C-erbb-2 entre o TM humano e o TM canino permanecem desconhecidos (HSU et al., 2009).

O índice de mortalidade de mulheres devido ao câncer de mama vem declinando nas últimas décadas devido a vários fatores como, por exemplo, o tratamento precoce e uma maior variabilidade de tratamentos (RASOTTO et al., 2014). Segundo Sassi et al. (2010), a classificação dos TM caninos, assim como em humanos, quanto a sua identidade molecular em luminal A (Receptor de estrógeno (RE) ou receptor de progesterona (RP) positivo e C-erbb-2 negativo), luminal B (RE ou RP positivo e C-erbb-2 positivo), C-erbb-2 (RE e RP negativos e C-erbb-2 positivo) e basal (RE, RP e C-erbb-2 negativos) pode interferir no prognóstico do tumor.

Beha et al. (2014) cita que nos TM caninos e felinos, assim como nos humanos, o sistema de classificação baseado em uma identificação molecular é adotado como ferramenta preditiva para o prognóstico, assim como para nortear a conduta terapêutica. Assim, enquanto os carcinomas mamários luminais teriam boa resposta aos tratamentos endócrinos associados à quimioterapia, os C-erbb-2 seriam adequados a uma terapia humoral anti-C-erbb-2. Por outro lado, os tumores basais não são responsivos aos tratamentos endócrinos ou humorais, sendo tratados apenas com quimioterapia ou cirurgia (BRUNETTI et al. 2013).

Na prática diagnóstica, a confecção de um painel imuno-histoquímico é uma ferramenta capaz de identificar esses subtipos tumorais, sendo mais prático para o clínico do que a caracterização do perfil de expressão gênica destes tumores por técnicas moleculares (RASOTTO et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar, por meio da imuno-histoquímica, as células do infiltrado inflamatório e as citocinas pró e anti-inflamatórias nos carcinomas mamários caninos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Determinar a proporção de macrófagos, linfócitos T, linfócitos T auxiliares, CTLs, IL-10, IL-4, INF- γ , Tregs e MIF, nos carcinomas mamários simples caninos, por meio de imuno-histoquímica.
- Realizar a classificação da identidade molecular pela imunomarcção dos receptores de estrógeno e progesterona e de C-erbb-2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Neste estudo prospectivo foram utilizadas 81 amostras de tecido mamário de cadelas, pertencentes a animais sem predisposição racial, de idade ou peso. Para tanto, instituíram-se dois grupos experimentais:

1. Grupo controle (GC), com 9 amostras de tecidos mamários de cadelas. Os animais que compõem o GC foram encaminhados ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, devido a óbito por causas distintas. Apenas foram utilizados animais que não apresentaram qualquer evidência de neoplasia, mastite ou processo infeccioso.
2. Grupo com amostras de tecidos de animais acometidos por tumores mamários classificados como carcinomas simples (GT), com 72 duas amostras de carcinomas simples como única neoplasia do paciente e ausência de outras doenças infecciosas ou outras alterações mamárias. As amostras que compõem o GT foram colhidas no Serviço de Obstetrícia Veterinária e no Serviço de Oncologia Veterinária, da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP. As colheitas ocorreram no período de março de 2011 a março de 2014.

Posteriormente, o GT foi subdividido em:

- Grupo constituído por carcinomas papilares (GCP): 25 amostras.

- Grupo constituído por carcinomas tubulares (GCT): 27 amostras.
- Grupo constituído por carcinomas sólidos (GCS): 20 amostras.

Esta subdivisão possibilitou confrontar os diferentes tipos histológicos de carcinomas mamários simples sempre que houve diferença estatística entre o GC e o GT para identificar os tipos histológicos mais afetados por um determinado parâmetro.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Jaboticabal pelo Protocolo nº 005925/13.

4.2 Análise Histopatológica

Os fragmentos de tecido mamário do GC foram colhidos durante a necropsia dos animais. Os fragmentos de tumor mamário dos animais do grupo GT foram colhidos por após mastectomia. Logo após a colheita, os fragmentos foram imersos em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) para fixação por 48 horas, sendo posteriormente armazenados em álcool 70% até o processamento rotineiro e inclusão em parafina realizado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP, Jaboticabal. Cortes de 5µm foram feitos em micrótomo e posteriormente corados pelo método da Hematoxilina e Eosina. A análise foi realizada em microscópio de luz Nikon Eclipse E200 em objetiva de 40x, com área de 0,19625 mm². Fotomicrografias digitais foram obtidas com auxílio de câmara de vídeo Moticam 2300, em objetiva de 40x.

A classificação histológica dos tumores seguiu a orientação do “Consenso para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias mamárias da cadela - 2013” (CASSALI et al., 2014).

4.3 Análise Imuno-histoquímica

Os fragmentos de tecido mamário, incluídos em parafina, foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica por meio do complexo de polímeros ligados a peroxidase (Kit Revel, Spring Cat SPB 125) ou complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase (KIT LSAB, Dako, Cat K069011-2), conforme descrito na Tabela 1.

De forma geral o procedimento comum a todos os anticorpos foi:

Passo 1: Desparafinização dos cortes de tecido mamário em estufa a 60°C por 1 hora, seguido de banhos em xilol (I e II) por 10 minutos cada. Após isso os cortes passaram por processo de hidratação em baterias de álcool absoluto I, II, III, 95%, 80%. Em seguida os cortes foram lavados 10 vezes em água destilada.

Passo 2: Recuperação antigênica em panela de pressão tipo Pascal (Dako, cód. S2800) em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) ou de Tris-EDTA (pH 9,0).

Passo 3: Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio (30 v/v) (30 v/v) e metanol a 8%, à temperatura ambiente (25°C), em câmara úmida por 30 minutos ou produto comercial (Hydrogen peroxidase block, Spring, cód. DHP125).

Passo 4: Bloqueio das proteínas inespecíficas com produto comercial (Protein Block Serum-Free, Dako, cód. X0909) por 20 minutos, à temperatura ambiente e um

segundo bloqueio, com leite em pó a 8% (leite em pó desnatado, Molico), por 60 minutos.

Passo 5: Incubação dos anticorpos (Tabela 1) por 18 horas a 4°C.

Passo 6: Anticorpos secundários foram incubados segundo as recomendações de cada fabricante, exceto no Kit HRP (Spring Cód. SPB 125), onde o complemento foi utilizado por 30 minutos.

Entre cada uma das etapas, quando requerido, realizou-se banhos em solução tampão TBS (Tris 20 mM e NaCl 0,5 M), pH 7,4.

Passo 7: Visualização da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO, cód. K3468), por 3 minutos para todos os anticorpos. Seguiu-se a imersão dos cortes em água deionizada para parar a reação com DAB.

Passo 8: Contra coloração com Hematoxilina de Harris e montagem das lâminas com Entellan (Merck).

Passo 9: Contagem das células imunomarcadas. A contagem foi feita em cinco campos de grande aumento (objetiva de 40), procurando os campos de maior concentração de células imunomarcadas. Os valores foram somados e divididos por cinco. Esta média foi utilizada para as análises estatísticas.

Tabela 1. Identificação dos anticorpos, fabricante, código, espécie de origem, diluição, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, substrato, utilizados no experimento.

Anticorpo	Marca	Código	Espécie de origem	Diluição	RA	BPE 30'	Substato
Macrófagos ¹	Serotec	MCA874G	Camundongo	1:3500	Cit 6	M+P A	LSAB
CD3*	DAKO	M 7254	Coelho	1:350	Cit 6	M+P A	HRP
CD4*	VBP	IM-0454	Coelho	1:500	TE 9	HPB D	HRP
CD8*	VBP	IM-0455	Coelho	1:300	TE 9	HPB D	HRP
FoxP3*	Biorbyt	Orb 18370	Cabra	1:1000	TE 9	M+P A	LSAB
IL-10*	Biorbyt	Orb 100193	Coelho	1:400	Cit 6	M+P A	HRP
IL-4 ²	R&D	Mab 4571	Camundongo	1:1500	TE 9	HPB D	HRP
TGF- β *	Santa Cruz	Sc-146	Coelho	1:400	TE 9	HPB D	HRP
IFN- γ *	Santa Cruz	Sc- 20106	Coelho	1:700	Cit 6	M+P D	HRP
MIF*	Santa Cruz	Sc 20121	Coelho	1:700	TE 9	M+P A	HRP
RE*	Biorbyt	Orb 10612	Coelho	1:150	TE 9	M+P A	HRP
RP*	Biorbyt	Orb 11299	Coelho	1:200	TE 9	M+P A	HRP
C-erbb-2	Biorbyt	Orb 13464	Coelho	1:400	TE 9	M+P A	HRP

*Policlonal. 1 Clone MAC387. 2 Clone 140417. RE (Receptor de estrógeno). RP (Receptor de progesterona). RA (Recuperação antigênica), CIT 6 (Tampão citrato pH 6,0) e TE 9 (Tampão Tris-Edta pH 9,0). BPE 30' (Bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos), M+P (Metanol adicionado de 8% de peróxido de hidrogênio), HPB (Hydrogen peroxidase block – comercial), A (bloqueio antes da incubação do anticorpo primário), D (bloqueio depois da incubação do primário). LSAB - complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase, HRP - complexo de polímeros ligados a peroxidase. DAB 3' (cromógeno diaminobenzidina por 3 minutos). Todos os espécimes passaram por 2 bloqueios das proteínas inespecíficas com Protein block (comercial) por 20 minutos e Leite em pó a 8% por 60 minutos.

4.4 Determinação da Identidade molecular

A classificação da identidade molecular foi realizada por meio de um painel imuno-histoquímico composto pelos anticorpos anti-RE, anti-RP e anti C-erbb-2.

Para a análise dos diagnósticos moleculares, as amostras do GT foram subdivididas segundo a metodologia de Sassi et al. (2010), nos seguintes subtipos:

- Grupo luminal A (GLA), apresentando imunomarcação de RE ou RP positivo e C-erbb-2 negativo (19 amostras);
- Grupo luminal B (GLB), RE ou RP positivo e C-erbb-2 positivo (12 amostras);
- Grupo C-erB-2 (GCE2), RE e RP negativo e C-erbb-2 positivo (25 amostras) e;
- Grupo basal (GBL), RE, RP e C-erbb-2 negativo (16 amostras).

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste T de Student para a análise das m dias de imunomarcações dos anticorpos. Quando os grupos foram subdivididos em subgrupos histológicos ou moleculares, realizou-se análises de variância (Anova) confrontando-se as imunomarcações dos anticorpos pelo fator grupo. Para a análise de subtipos da identidade molecular não confrontou-se os dados com o GC.

O teste para múltiplas m dias de Student Newman Keuls (SNK) foi utilizado juntamente com o Anova. Para avaliar as homocedasticidade foi utilizado o teste de Brown e Forsythe e para a análise da normalidade da distribui o dos erros foi utilizado o teste de Cramer von Mises. Quando a homocedasticidade e/ou a normalidade não foram satisfeitas, realizaram-se transforma es de dados segundo

Bartlett (1947). Persistindo as alterações, utilizaram-se os testes de Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) para apenas dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis (KW) quando houve a subdivisão do GT.

Foi realizado um teste qui-quadrado para verificar a associação entre o tipo histológico e a identidade molecular dos tumores

Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa estatístico SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Histologia

A frequência de tumores segundo seu padrão histológico é apresentada na **tabela 2**.

Tabela 2. Frequência de tumores segundo os padrões histológicos dos carcinomas simples observados nas mamas caninas com tumor, Jaboticabal, SP, março de 2011 a março de 2014.

Padrão Histológico	Valor Absoluto	Frequência
Carcinoma padrão Papilar	25	34,72%
Carcinoma padrão Tubular	27	37,5%
Carcinoma padrão Sólido	20	27,78%
Total	72	100%

4.2 Análise Imuno-histoquímica

4.2.1 Imunomarcação de macrófagos e MIF

A imunomarcação para macrófagos, assim como para as células secretoras de MIF foi caracterizada por uma marcação positiva do citoplasma das células (**Figura1**) em um padrão difuso, tanto peritumoral quanto intratumoral. O MIF apresentou imunomarcação positiva em macrófagos, linfócitos e neutrófilos.

A contagem de macrófagos imunomarcados (**Figura 2**) indicou diferença significativa entre o GC e o GT ($p < 0,0003$ -MWW). Houve diferença no teste de KW

entre o grupo GC e os grupos GCS, GCT e GCP ($p < 0,00001$), com menor média no GC. O GCS diferiu dos GCP GCT ($p < 0,00001$), com menor média para o GCS (**Figura 3**).

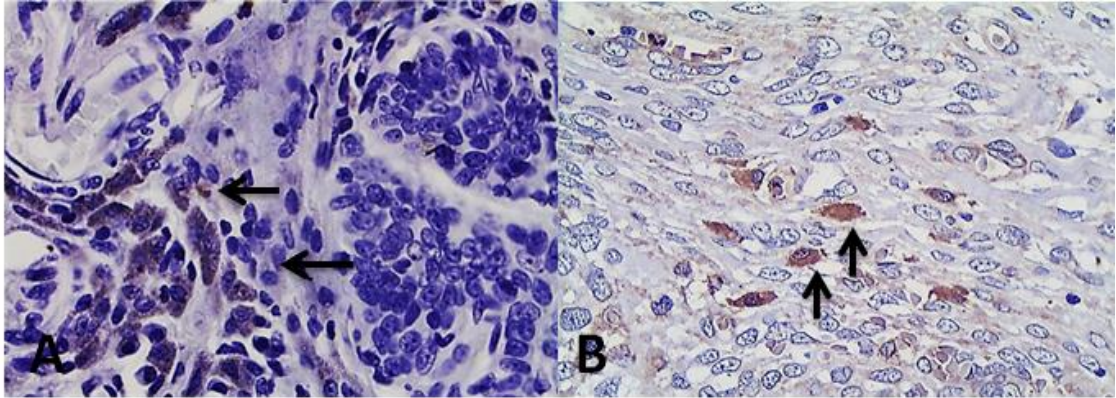


Figura 1. Fotomicrografias de carcinoma mamário canino, padrão sólido. A) Notar imunomarcagem para macrófagos (setas). B) Notar células imunomarcadas (setas) para MIF em leucócitos. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Objetiva de 40x. Complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase (LSAB). Objetiva de 40x.

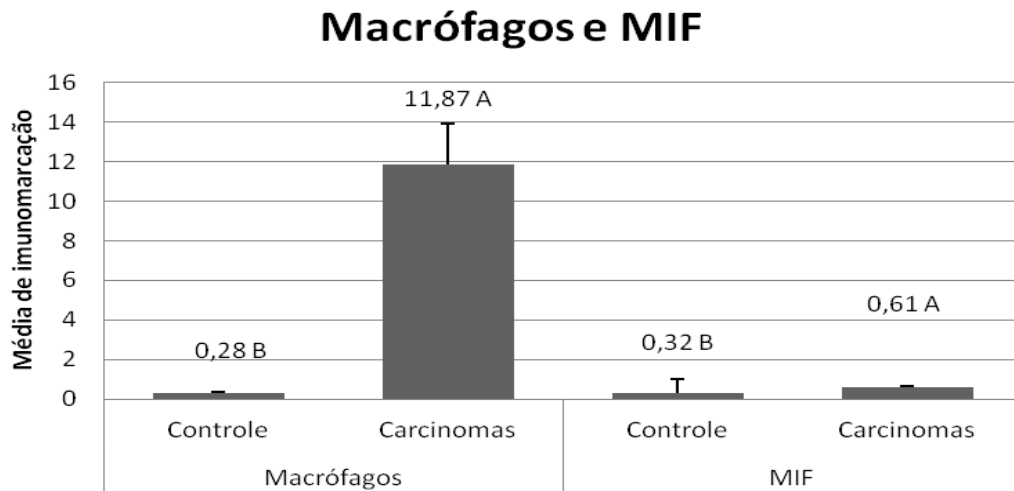


Figura 2. Média de imunomarcagem para os anticorpos anti-macrófagos e anti-MIF. Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%.

A imunomarcação para MIF apresentou diferença significativa entre o GC e o GT ($p < 0,0335$ - MWW). Diferenças significativas também foram observadas entre o GC e os grupos GCP e GCT ($p < 0,0463$ - SNK).

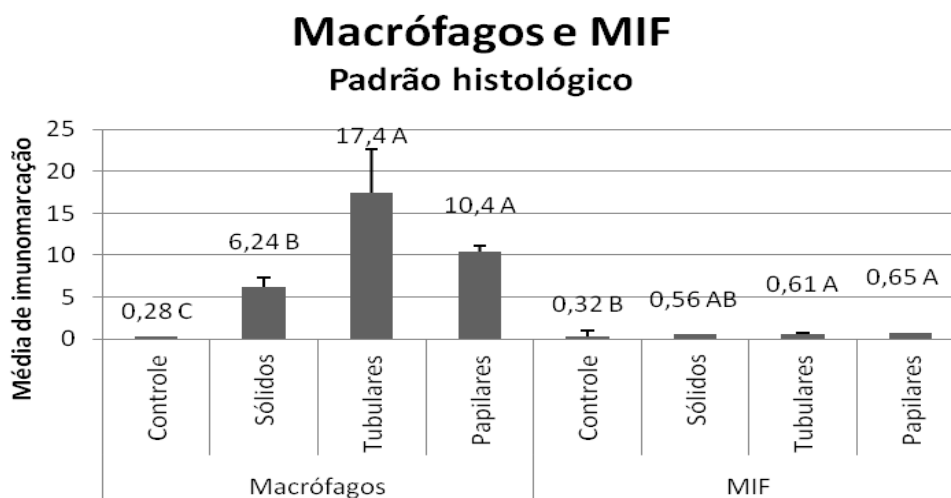


Figura 3. Média de imunomarcação para os anticorpos anti-Calprotectina (macrófago) e anti-MIF. Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%.

4.2. Linfócitos

Os linfócitos T, imunomarcados pelos anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8e anti-FoxP3 (Treg)(**Figura 4**) apresentaram imunomarcação difusa no tecido mamário, em região peritumoral e intratumoral, principalmente próximos a ductos e vasos. O padrão de marcação dos anticorpos foi intracitoplasmático, porém para as marcações de CD4 e CD8 verificou-se marcação também em membrana. A imunomarcação do FoxP3 foi predominantemente intracitoplasmática.

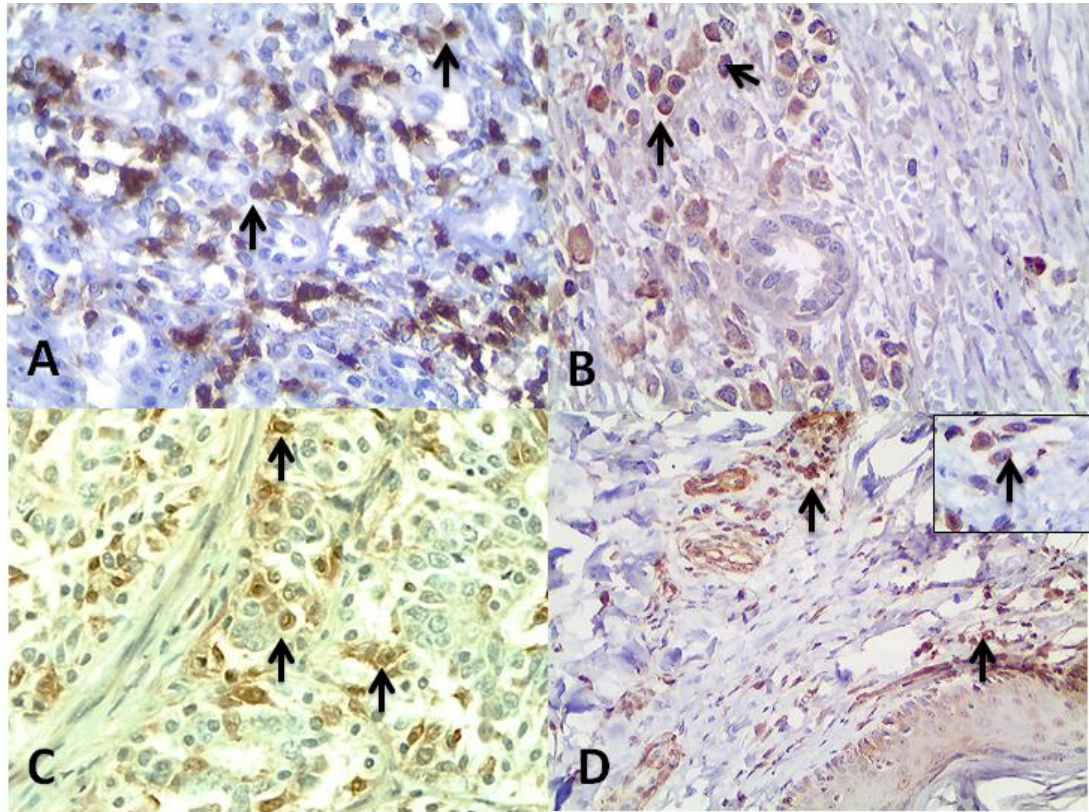


Figura 4. Fotomicrografias de carcinomas tubulares mamários caninos. A) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-CD3 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. B) Imunomarcagem para o anticorpo anti-CD4 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. C) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-CD8 (setas). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 40x. D) Células imunomarcadas para o anticorpo anti-FoxP3 (setas / detalhe). Complexo Estreptavidina Biotina-Peroxidase (LSAB). Obj. 10x, no detalhe 40x.

Os linfócitos T (CD3) apresentaram diferença significativa entre os grupos GC e GT ($p < 0,0001$ - MWW). Pelo teste de KW, as diferenças apareceram entre o GC e os grupos GCP, GCT e GCS ($p < 0,0002$), com médias inferiores para o GC. Entre os grupos portadores de carcinoma não foram observadas diferenças (**Figuras 9 e 10**).

Para os linfócitos T auxiliares (CD4) foi observada diferença significativa entre o GC e o GT ($p < 0,0001$ - MWW). O teste de KW mostrou diferença entre o grupos GCP e os demais ($p < 0,0001$) apresentando a maior média. O GCT diferiu do GCS e do GC ($p < 0,0001$). Não foi observada diferença entre o GC e o GCSol.

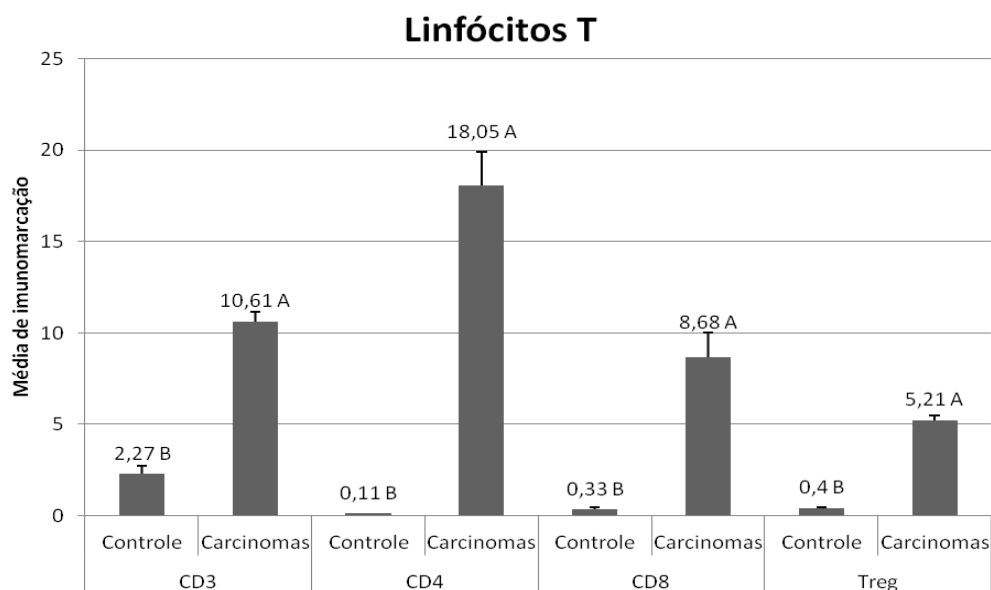


Figura 5. Média de imunomarcção para os anticorpos anti-CD3, CD4, CD8 e FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%.

Os CTL (CD8), mostraram diferença entre os grupos GC e o GT ($p < 0,0001$ - MWW). Pelo KW o GCT apresentou média significativamente maior que todos os demais grupos ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças entre os outros grupos.

Quanto aos Tregs (FoxP3), o teste T apresentou diferença entre os grupos GC e GT ($p < 0,0001$). O teste de SNK indicou média significativamente inferior para o GC

e os outros grupos $p < 0,0001$). O GCS mostrou ainda diferença entre os grupos GCP e GCT ($p < 0,0001$), com menor médias nos tumores sólidos.

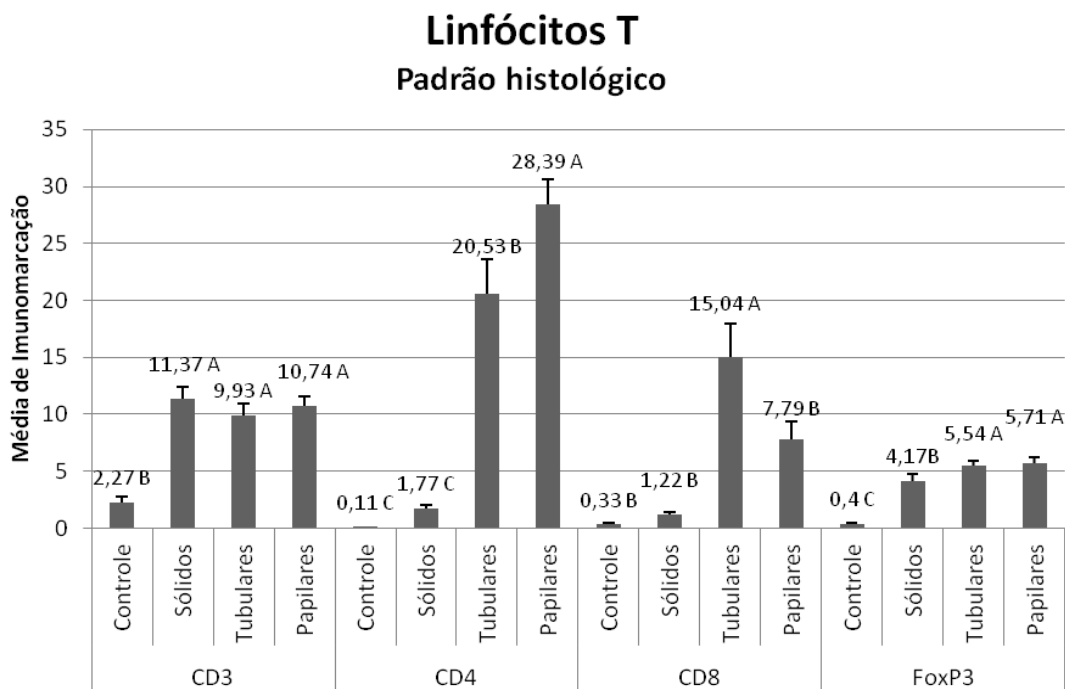


Figura 6. Média de imunomarcagem para os anticorpos anti-CD3, CD4, CD8 e FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%.

4.2.3 Citocinas

As citocinas apresentaram de forma geral uma marcação difusa e intratumoral, muitas vezes observada em células tumorais e leucócitos, bem como na mama adjacente ao tumor. No caso do $\text{IFN-}\gamma$, marcação de grânulos intracitoplasmáticos, enquanto a IL₁₀ e a IL-4 apresentam marcação também pelas células tumorais (**Figura 7**).

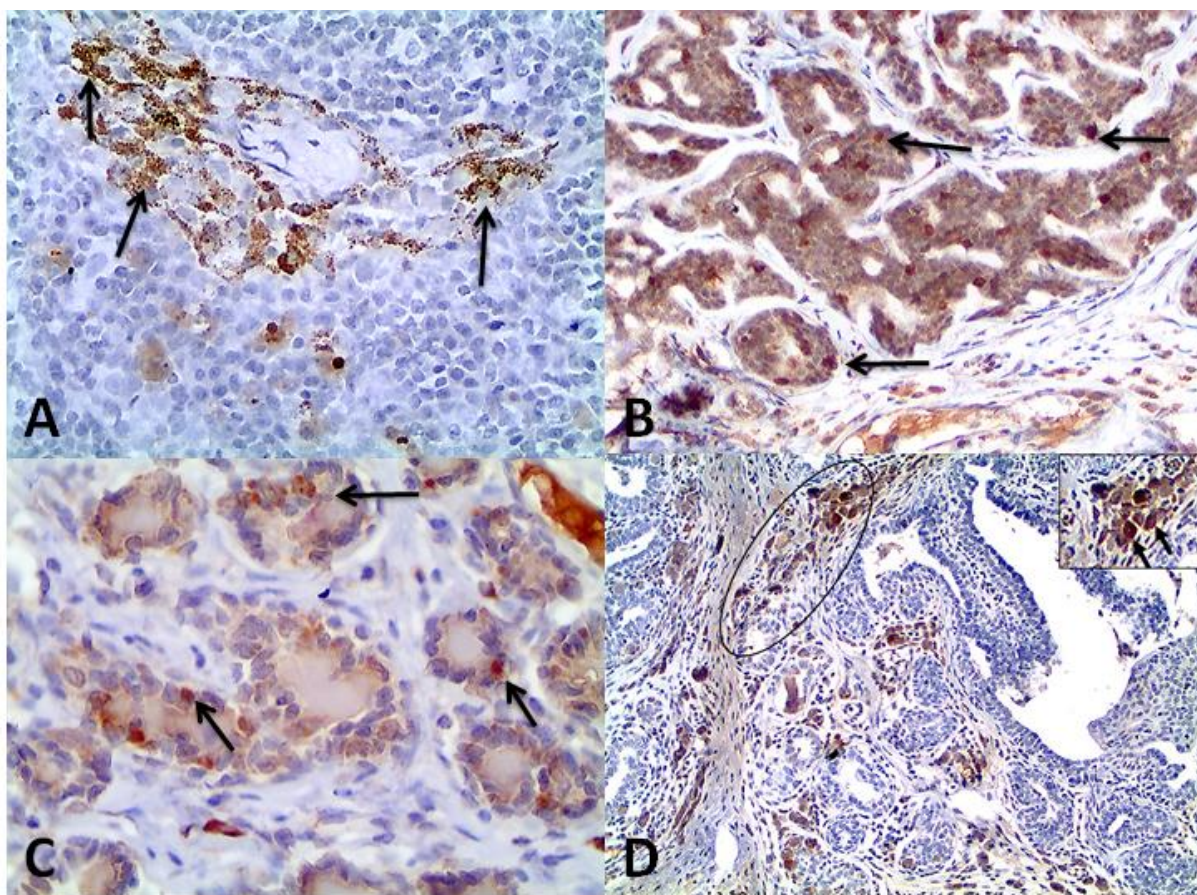


Figura 7. Fotomicrografias de tumores mamários caninos. A) Carcinoma padrão sólido evidenciando área de células imunomarcadas para o anticorpo anti-IFN- γ (setas / Obj. 20x) B) Carcinoma padrão tubular evidenciando imunomarcção do anticorpo anti IL-10 (setas / Obj 20x) C) Carcinoma padrão tubular evidenciando imunomarcção no tecido para o anticorpo anti IL-4 (setas / Obj. 40x). D) Carcinoma padrão papilar evidenciando área de células imunomarcadas para o anticorpo anti-TGF- β (elipse). No detalhe células imunomarcadas para TGF- β (setas / Obj. 10x, no detalhe 20x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP).

O IFN- γ não apresentou diferença entre o GC e o GT pelo teste T ($p < 0,4011$), porém quando se avaliou o tipo histológico (teste SNK) houve diferença entre o grupo GCS e os demais ($p < 0,0001$), com menor média para o grupo de tumores sólidos (Figuras 8 e 9).

Para a IL-10, a imunomarcação foi maior no grupo GT em relação ao GC pelo teste de MWW ($p < 0,00001$). Quando subdividido, todos os grupos se diferenciaram do GC, mas não houve diferenças significativas entre os grupos portadores de carcinomas.

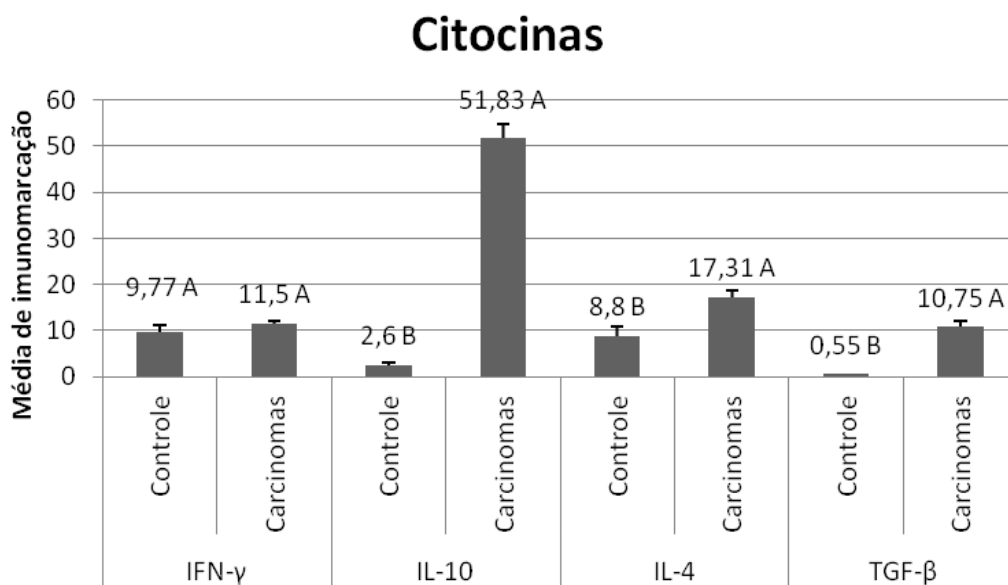


Figura 8. Média de imunomarcação para os anticorpos anti-IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos entre amostras de animais controles e portadores de carcinoma mamário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes T ou MWW, com nível de significância de 5%.

A IL-4 apresentou diferença significativa entre os grupos GC e GT pelo teste T ($p < 0,0044$). O teste SNK mostrou que os grupos GC e GCS não apresentaram diferença entre si, mas ambos diferiram dos grupos GCP e GCT ($p < 0,0001$).

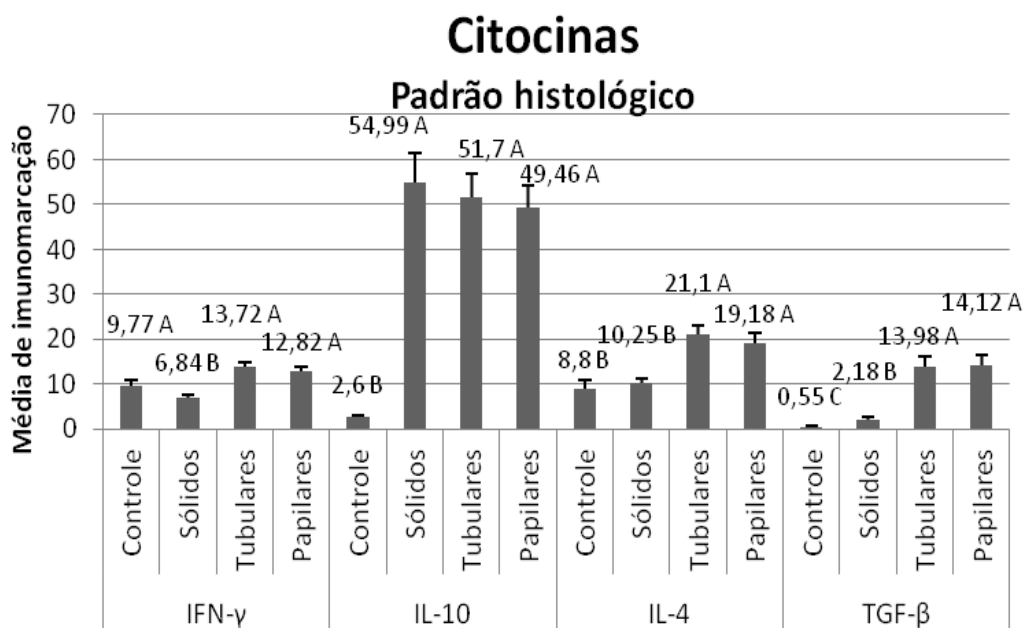


Figura 9. Média de imunomarcacão para os anticorpos anti-IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos segundo o padrão histológico dos carcinomas mamários caninos. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os testes de SNK ou KW, com nível de significância de 5%.

A imunomarcacão para TGF- β apresentou, pelo teste de MWW, diferença significativa entre o GC e o GT ($p < 0,0001$). Pelo teste SNK o GC diferenciou-se dos grupos GCP, GCT e GCS ($p < 0,0001$). O grupo GCS ainda apresentou diferença com os grupos GCP e GCT ($p < 0,0001$).

4.2.4 Análise da identidade molecular

Quando os tumores foram agrupados segundo sua identidade molecular, verificou-se as frequências descritas na **Tabela 3**. Não procedeu-se a contagem das células, apenas a verificacão de imunomarcacão das células neoplásicas para os referidos anticorpos. A imunomarcacão foi considerada positiva para RE e RP quando

coloração nuclear foi encontrada em pelo menos 5% de células de tumor. A imunomarcação para o C-erbb-2 foi considerada positiva quando pelo menos 10% das células tumorais mostrou coloração de intensidade moderada a forte em membrana ou citoplasma, de acordo com Sassi et al. (2010).

Tabela 3. Frequência de padrões moleculares dos carcinomas simples observados nas mamas caninas, Jaboticabal, SP, março de 2011 a março de 2014.

Identidade molecular	Valor Absoluto	Frequência
Luminal A	19	26,39%
Luminal B	12	16,67%
C-erB-2	25	34,72%
Basal	16	22,22%
Total	72	100%

A determinação dos subtipos moleculares foi feita segundo a positividade ou não aos anticorpos anti-RE, anti-RP, anti-C-erbb-2 (**Figura 10**). Quando superexpresso, o C-erbb-2, pode apresentar marcação em membrana ou intracitoplasmática em tumores mamários humanos (DE MARIA et al., 2005).

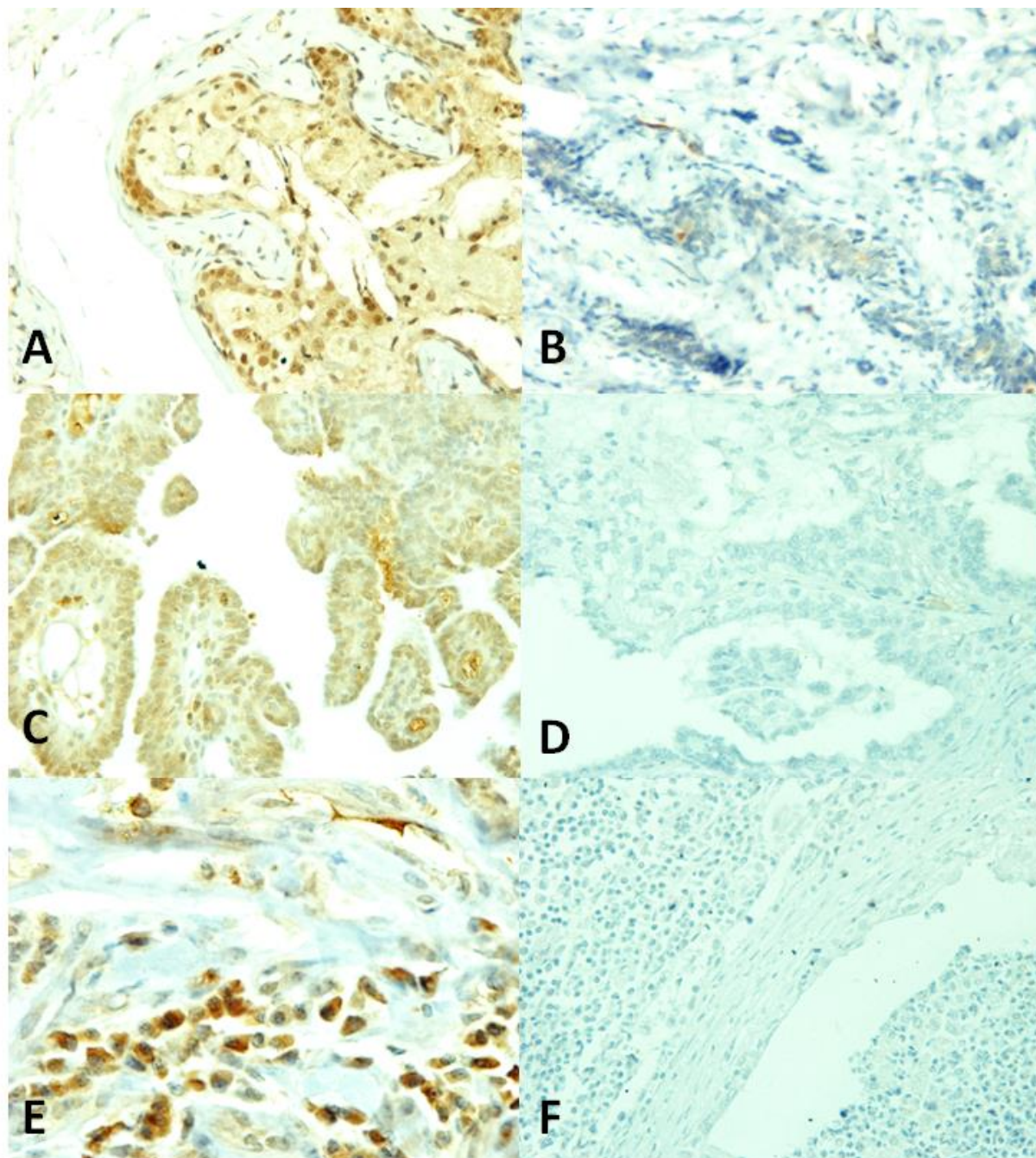


Figura 10. Fotomicrografia de tumor mamários caninos. A, C e E) Tumores apresentando imunomarcção positiva para o anticorpo anti-RE, Anti RP e anti C-erbB-2, respectivamente. Notar marcação intranuclear. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 20x. B, D e F) Tumores apresentando imunomarcção negativa para os anticorpo anti-RE, anti-RP e anti Cerbb-2. Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP). Obj. 10x.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (**Figuras 11 e 12**), exceto para a imunomarcção de CTLs (CD8), que apresentou menor imunomarcção nos carcinomas basais que nos outros grupos ($P < 0,0489$ – KW), e de IL-4, que, assim como os CTLs, apresentaram uma marcada diminuição nos carcinomas basais ($p < 0,0329$).

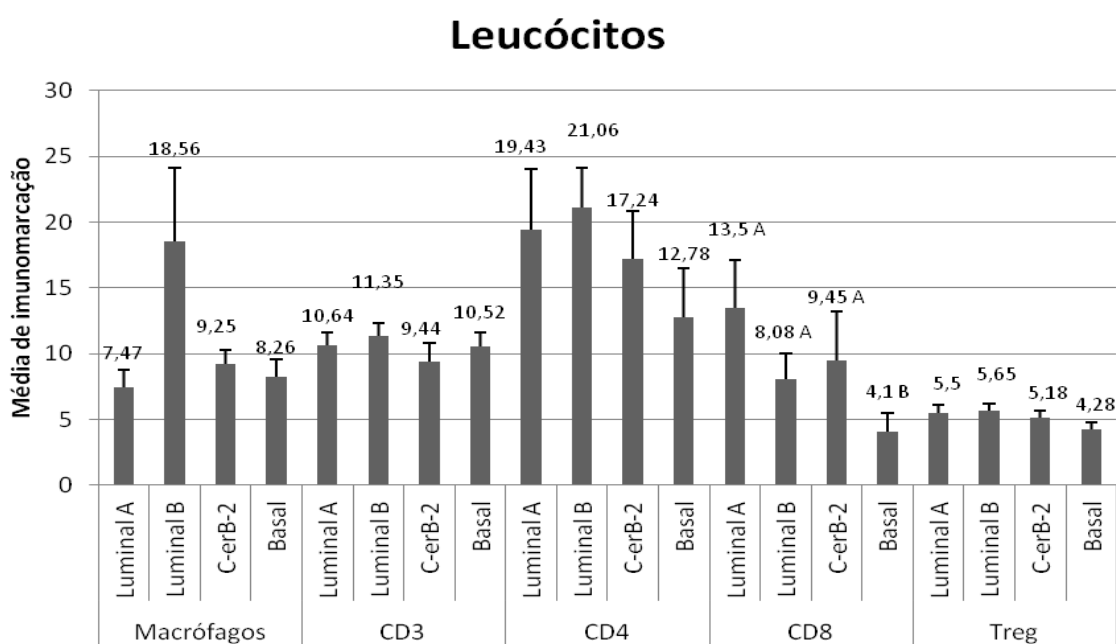


Figura 11. Média de imunomarcção para os anticorpos anti-Calprotectina (macrófagos), CD3, CD4, CD8 E FoxP3 (Treg). Os grupos estão divididos segundo os subtipos moleculares dos tumores mamários. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os teste de SNK ou KW, com nível de significância de 5%. Apenas o anticorpo que apresenta diferença (CD8) está marcado com letras.

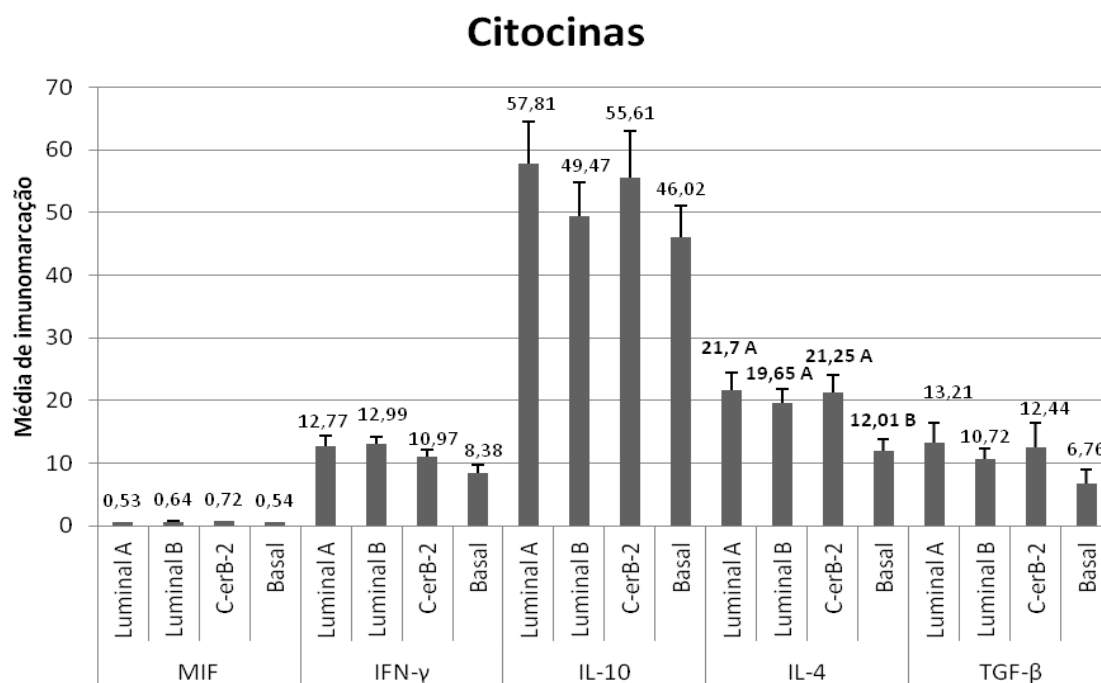


Figura 12. Média de imunomarcção para os anticorpos MIF, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Os grupos estão divididos segundo os subtipos moleculares dos tumores mamários. Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, para cada anticorpo, segundo os teste de SNK ou KW, com nível de significância de 5%. Apenas o anticorpo que apresenta diferença (IL-4) está marcado com letras.

Não foi observada associação, pelo teste qui-quadrado ($p < 0,9745$), entre os tipos histológicos e a Identidade molecular das amostras. O número de amostras segundo seu tipo histológico e identidade molecular se encontram na **Tabela 4**.

Tabela 4. Quantidade de tumores mamários segundo sua identidade molecular e seu tipo histológico utilizados no experimento.

Tipo histológico	Identidade molecular				Total
	Luminal A	Luminal B	C-erbb-2	Basal	
Papilar	5	2	11	7	25
Tubular	4	7	10	6	27
Sólido	10	3	4	3	20
Total	19	12	25	16	72

VI. DISCUSSÃO

Embora nossos resultados tenham mostrado frequências semelhantes entre a prevalência de carcinomassimples, com sutil preponderância de tumores tubulares e menor presença de tumores sólidos, estas frequências não podem ser utilizadas como parâmetro epidemiológico, uma vez que a colheita de tumores foi, na realidade, muito mais extensa, porém apenas as amostras que se adequaram ao estudo (carcinomas simples como única neoplasia do paciente e ausência de outras doenças infecciosas e outras alterações mamárias) foram utilizadas. Portanto a prevalência apresentada não possui valor epidemiológico, apenas servindo para indicar ao leitor o equilíbrio estatístico entre os grupos avaliados.

Quanto aos macrófagos, os TAMs representam um proeminente componente dos infiltrados leucocitários na maioria dos tumores malignos e dão suporte ao crescimento dos TM, pela inibição da atividade de linfócitos no sítio tumoral decorrente da produção de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e propiciam a formação de metástases. (KLIMP et al., 2002; HAGEMANN et al., 2005; WHITESIDE, 2008). Portanto é compreensível e esperada a diferença estatística entre o GC e os grupos afetados por TM como o encontrado neste estudo. O fato dos tumores sólidos apresentarem menor contagem de macrófagos que os tumores papilares e tubulares, pode estar relacionado com a menor expressão de epítomos que seriam reconhecidos pelo sistema imune por este tipo histológico, passando despercebido pelo sistema imune. Na rotina de diagnóstico histopatológico dos tumores mamários de cadelas, comumente não se observa infiltrado inflamatório intra ou peritumoral nos carcinomas

sólidos de mama. Este tipo histológico possivelmente seria menos imunogênico que os demais, facilitando seu crescimento e evasão imune.

A imunomarcção para MIF mostrou maior número de células nos carcinomas papilares e tubulares em relação ao GC, isto deve-se a maior atividade dos linfócitos e macrófagos nestes tumores, como demonstram nossos resultados. Oda et al. (2008) afirma que o MIF representa um importante elo entre a inflamação e o câncer devido a seus efeitos sobre a resposta inflamatória, promovendo a proliferação e a invasividade tumoral e relaciona sua expressão à malignidade da neoplasia. Citam, porém, a maior expressão de MIF em tumores sólidos, o que não ocorreu no presente estudo. O MIF possui ação pleiotrópica, atuando na angiogênese, tumorigênese e proliferação celular (ARMSTRONG, 2008; LO et al., 2013) e isto parece estar de encontro com a maior estabilidade dos tumores sólidos em relação as alterações de seu microambiente tumoral. Portanto, a maior imunomarcção para MIF parece estar relacionada em uma maior atividade do microambiente tumoral em tumores papilares e tubulares.

A maior densidade de linfócitos T nos animais com TM em relação ao grupo controle está de acordo com os dados da literatura, que relacionam a presença de linfócitos com características de malignidade e com pior prognóstico (COUSSENS; POLLARD, 2011). Linfócitos isolados de carcinomas mamários humanos apresentam níveis elevados de citocinas do tipo Th2, como a IL-4. Neste estudo, a presença de linfócitos T nos carcinomas mamários caninos pode estar relacionada com um predomínio de células Th2, cujo perfil de citocinas atua no crescimento e desenvolvimento de metástase (KOHRT et al., 2005). O fato de ser observado neste

estudo um aumento no número de imunomarcações de células T nos carcinomas, assim como um aumento nos níveis de IL-4, TGF- β e IL-10 e diminuição do IFN- γ (nos tumores sólidos) sugere uma resposta predominante do tipo Th2. Assim, o infiltrado inflamatório de linfócitos nos carcinomas mamários caninos poderia estar auxiliando a evasão tumoral, uma vez que as respostas do tipo Th2 são ineficientes no combate ao tumor (SATYAM et al., 2011).

Neste estudo, os linfócitos T auxiliares apresentaram maior imunomarcação nos tumores papilares, seguidos pelos tubulares e um aumento marcadamente menor nos sólidos, isso mostra uma relação entre a malignidade tumoral e a presença de linfócitos T auxiliares. Isso possivelmente se deva a menor produção de IL-4 e de IFN- γ nos tumores sólidos.

Os CTLs são indicados como as células de eleição para um combate efetivo contra as células tumorais, produzindo uma resposta adquirida celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Os resultados demonstraram um aumento na quantidade de CTLs em tumores tubulares, embora, com menor intensidade que os linfócitos T auxiliares, corroborando com a literatura, que demonstra menor infiltração nos tumores mamários por CTLs (GARCÍA-MARTÍNEZ et al. 2014). A ação celular dos CTLs pode estar diminuída pela ação de diversos fatores, entre os quais a supressão de receptores apoptóticos e também a supressão da expressão de moléculas de MHC I nas células tumorais, tornando as células tumorais livres da apoptose induzida pelos CTLs (TÖPFER et al., 2011).

Os linfócitos Tregs, um constituinte particular dos linfócitos T auxiliares com função de regular outras células do sistema imune (RISSETO et al., 2010) e

apresentaram, neste estudo maior número nas amostras do GT do que no GC. Esta é uma alteração esperada, posto que a diferenciação destas células é dependente da ação de IL-10 e TGF- β (BILLER et al., 2007), que neste estudo também se apresentaram aumentados GT. Há evidências de que as Tregs podem ser induzidas pelo próprio tumor, suprimindo a resposta do sistema imune aos antígenos tumorais, possivelmente pelo mimetismo das células tumorais em secretar citocinas como a IL-10 e o TGF- β (O'NEILL et al, 2009; STANDISH et al., 2008), assim como evidenciado neste trabalho.

A imunomarcagem de para o IFN- γ não mostrou diferença quando comparados os GC e o GT, mas apresentou menor número de células imunomarcadas nos tumores sólidos. Este fato pode ser decorrente de uma ação paradoxal do IFN- γ que, ao ativar o STAT1 por sua vez ativam supressores celulares derivados de células mieloides, que inibem a ação antitumoral das células locais (PEROU et al., 1999; HIX et al., 2013). Reome et al. (2004) afirma que o IFN- γ é a principal citocina para a ativação de um perfil Th1 de linfócitos auxiliares e, normalmente, está suprimido durante o desenvolvimento tumoral. Isto poderia explicar a sua imunomarcagem pouco expressiva nos observados neste estudo.

Os resultados mostram que o aumento da expressão de IL-10 está associado à presença de neoplasia mamária, mas não aos seus subtipos histológicos. Independente do padrão histológico do carcinoma, esta citocina poderia estar contribuindo com a inibição da ativação de macrófagos do tipo M1 e de linfócitos T de perfil de resposta Th1, decorrente da supressão na secreção do IFN- γ (REOME et al., 2004; HODI; SOIFFER, 2002). A relação direta entre a intensidade da inflamação e a

imunomarcacão para IL-10 sugere que o aumento na presença de linfócitos está vinculado a um aumento na presença de Tregs no sítio tumoral, posto que as Tregs se diferenciam na presença de IL-10, causando um incremento no infiltrado inflamatório, mas tornando-o imunologicamente ineficiente.

A imunomarcacão para IL-4 e TGF- β foi maior nos tumores tubulares e papilares quando comparados com o GC e os tumores sólidos. Isso se deve, possivelmente, a maior atividade destes tipos tumorais e ao fato de células de TM estarem produzindo IL-4 e TGF- β (ZHANG et al., 2008; O'NEILL et al., 2009), resultando em maior proporo de macrófagos e Tregs nestes tipos histológicos.

Em estudos anteriores ficou evidente a relao entre a maior expressão, determinada por PCR em tempo real, dos genes IL-10 e IL-4 com a malignidade e a progressão tumoral, assim como a baixa expressão do gene de IFN- γ pelas células tumorais (CASTANHEIRA, 2013). Neste estudo, foram encontradas informaçoes semelhantes, porém, não podemos afirmar que a malignidade esteja diretamente relacionada com a imunomarcacão destas citocinas, posto que elas não mostraram maior atividade nos tumores sólidos, considerados de pior prognóstico. Mas há uma manuteno no equilíbrio, sobretudo da imunomarcacão pelo IFN- γ nos dois trabalhos, corroborando com a ideia de que o tumor induz a expressão de IFN- γ a manter um pseudo equilíbrio, e facilitando sua evasão do sistema imune. Isto corrobora ainda com Perou et al. (1999) e Hix et al (2013) quanto ao papel facilitador do IFN- γ para a progressão em tumores senescentes. Rosolem (2013) afirma que linfócitos, macrófagos e mastócitos podem ter influência no desenvolvimento tumoral. Esta afirmao corrobora com nossos resultados, que mostram aumento significativo

de linfócitos e macrófagos nos grupos de animais portadores de tumores. Porém, aqui podemos demonstrar que esta influência é decorrente principalmente dos linfócitos T auxiliares e Tregs, além dos macrófagos. Em estudos futuros seria interessante avaliar a atividade de linfócitos Th2 e de macrófagos tipo M2 nestes tipos histológicos de carcinomas para comprovarmos se estas células estariam diretamente envolvidas no desenvolvimento tumoral.

A classificação pela identificação molecular dos tumores apenas apresentou diferenças significativas para a quantidade de CTLs e a imunomarcação de IL-4, ambos apresentando um número significativamente menor nos tumores classificados como basais, que segundo a literatura, possuem o pior comportamento biológico, sendo pouco responsivos a tratamentos humorais ou endócrinos (BRUNETTI et al., 2013). A ausência de CTLs nos carcinomas basais corrobora com os achados histopatológicos, que indicam que os tumores mais agressivos possuem menor quantidade de CTLs que, por sua vez, possuem ação antitumoral mais efetiva que outros linfócitos (MAHMOUD et al., 2011). Tumores que secretam IL-4 inibem a proliferação de células basais e células induzidas por estrógeno, logo, é esperado que tumores basais apresentem imunomarcação diminuída de IL-4 (COUSSENS; POLLARD, 2011). Estes achados indicam que, apesar de outros parâmetros estudados neste trabalho não apresentarem diferenças significativas, novas avaliações devem ser realizadas para validar ou descartar a utilização desta classificação na rotina clínica veterinária.

7. CONCLUSÕES

1. Carcinomas mamários simples apresentaram aumento na proporção de macrófagos e subtipos de linfócitos T, mostrando pouca eficiência destas células no controle da neoplasia mamária.
2. O grupo carcinoma também teve detecção aumentada das citocinas MIF, IL-10, IL-4 e TGF- β , que possivelmente exerceram um papel pró-tumoral.
3. Os carcinomas mamários de padrão tubular e papilar estimularam mais a inflamação e a produção de citocinas associadas ao tumor, porém com resultados pouco protetores.
4. Os carcinomas sólidos tiveram menor imunodeteção de células inflamatórias e de citocinas, sugerindo uma capacidade de escape imune por pobre capacidade do tumor em expressar epitopes imunogênicos capazes de desafiar o sistema imune;
5. Os macrófagos e os linfócitos T CD4 predominaram nos carcinomas, sugerindo um perfil imunossupressor destes tipos celulares favorável ao tumor.
6. A baixa imunodeteção de IFN- γ no grupo com tumor mamário poderia explicar o papel pró-tumoral dos macrófagos associados ao tumor;
7. IL-10 apresentou alta proporção de células marcadas no grupo tumor, sendo muitas delas neoplásicas. A produção desta citocina imunossupressora é feita pelo tumor e por linfócitos Treg, contribuindo grandemente para a manutenção de um microambiente Th2 nos carcinomas mamários caninos.
8. Tumores com identificação basal apresentaram menor contagem de CTLs e de imunomarcagem para IL-4. Condizente com a condição de um tumor mais agressivo e não inibido pela ação da IL-4.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. **Elsevier Saunders**, 2012. p. 389-406.

ARMSTRONG, M.E.; GANTIER, M.; LI, L.; CHUNG, W.Y.; McCANN, A.; BAUGH, J.A.; DONNELLY, S.C. Small interfering RNAs induce Macrophage migration inhibitory factor production and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**. V. 180, p. 7125-33, 2008.

BABA, A.I.; CĂTOI, C. Mammary gland Tumours. In: Comparative Oncology. Bu//careste: **The Publishing House of the Romanian Academy**. p. 48, 2007. Acesso em 08/04/2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9542/?report=printable>.

BARDOU, VJ; ARPINO, G; ELLEDGE, RM; OSBORNE, CK; GARY, M.; CLARK, GM. Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. **Journal of Clinical Oncology**. v. 21, p.1973-79, 2003.

BARTLETT, M.S. The Use of Transformations. **Biometrics**, v. 3, n. 1, p. 39-52. 1947.

BEHA, G.; MUSCATELLO, L.V.; BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; POLI, A.; BENAZZI, C.; SARLI, G. Molecular phenotype of primary mammary tumours and distant metastases in female dogs and cats. **Journal Comparative Pathology**. v.150, p. 194-97. 2014.

BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; BURNETT, R.C.; AVERY, A.C.; DOW, S.W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 116, p. 69-78. 2007.

BOSE, A.; CHAKRABORTY, K.; SARKAR, K.; GOSWAMI, S.; HAQUE, E.; CHAKRABORTY, T.; GHOSH, D.; ROY, S.; LASKAR, S. Neem leaf glycoprotein directs T-bet-associated type 1 immune commitment. **Human Immunology**. v. 70, p. 6-15. 2009.

BRUNETTI, B.; ASPRONI, P.; BEHA, G.; MUSCATELLO, L.V.; MILLANTA, F.; POLI, A.; BENAZZI, C.; SARLI, G. Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumours and lymph node metastasis. **Journal Comparative Pathology**. v.148, p. 206-213. 2013.

CARVALHO, M.I.; ISABEL PIRES, I.; JUSTINA PRADA, J.; QUEIROGA F.L. A role for t-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. **BioMed Research International**. v. 2014. Acesso em : <http://dx.doi.org/10.1155/2014/130894>.

CASTANHEIRA, T. L. L. Expressão de citocinas em tecido e sua relação com a malignidade de tumores de mama em cadelas. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho"**, Jaboticabal, 2013.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 7, p. 38-69, 2014.

CHIKAMATSU, K.; SAKAKURA, K.; YAMAMOTO, T.; FURUYA, N.; WHITESIDE, T.L.; MASUYAMA, K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 44, p. 870-877. 2008.

COUSSENS, L.M.; POLLARD, J.W. Leukocytes in Mammary Development and cancer. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v. 3, p. 1-21. 2011. doi: 10.1101/cshperspect.a003285.

DE MARIA, R.; OLIVERO, M.; IUSSICH, S.; NAKAICHI, M.; MURAT A, T.; BIOLATTI, B.; DI RENZO, M.F. Spontaneous feline mammary carcinoma is a model of HER2 overexpressing poor prognosis human breast cancer. **Cancer Research**, v.65, p. 907-12, 2005.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 211-7. 2004. Doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BORROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.A.; SERAKIDES, R. CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic and survival rates. **Biomedical Central Cancer**, n.10, p.256. 2010. Acesso em <http://www.biomedicalcentral.com/1471-2407/10/256>.

FREITAS, C. S. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 54, n.1, p. 79-86. 2008.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Review Immunology**, v. 3, p. 23–35. 2003. Doi:10.1038/nri978.

HAGEMANN, T.; WILSON, J.; KULBE, H. et al. Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kB and JNK. **The Journal of immunology**. V. 175, p. 1197-1205, 2005.

HAO, N-B.; LÜ, M-H.; FAN, Y-H.; CAO, Y-L.; ZHANG, Z-R.; YANG, S-M. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental immunology**, v. 2012, p. 1-11. 2012. doi:10.1155/2012/948098.

HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHIMIDT, M.H.; HOLT, D.E.; SHOFER, F.S.; SMITH, A.; SORENMO, K.U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p.776-80, 2005

HIX, L.M.; KARAVITIS, J.; KHAN, M.W.; SHI, Y.H.; KHAZAIE, K.; ZHANG, M. Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 13, p. 1-20. 2013. Doi: 10.1074/jbc.M112.441402jbc.M112.441402.

HODI, F.S.; SOIFFER, R.J. Interleukin. In: BERTINO, J. Encyclopedia of cancer. **Academic Press**, 2002. p. 530-31.

HORIUCHI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NARIAI, Y.; ASANUMA, H.; KUWABARA, M. Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes – A flow cytometric study. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.118, p.179-185. 2007.

HORIUCHI, Y.; TOMINAGA, M.; ICHIKAWA, M. et al. Increase of regulatory T cell in the peripheral blood of dogs with metastatic tumors. **Microbiology and Immunology**. V.53, p. 468-474, 2009.

HSU, HC; CHANG, H; LIN, Y; HSEU1 ,S; CHEN, J; YANG, T; WANG, H; SHEN, W. The Role of HER2 in Metastatic Breast Cancer Treated with a Combination of Taxanes and Cisplatin. **Chang Gung Medical Journal**. v. 32, n.1, p.33-40, 2009.

IJICHI , N; SHIGEKAWA, T; IKEDA, K; HORIE-INOUE, K; FUJIMURA, T; TSUDAD, H; OSAKI, A; SAEKI, T; INOUE,S. Estrogen-related receptor modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. V.123, p. 1–7, 2011.

JENNER, R.G.; TOWNSEND, M.J.; JACKSON, I. et al. The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 106, n. 42, p. 17876-81. 2009.

KENNEDY, P.C.; MILLER, R.B. The Female Genital system, In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; Palmer, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4 ed., cap.4, p.349-469, 1993.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KOVRT, H.E.; NOURI, N.; NOWELS, K. et al. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. **PLOS Medicine**, v.2, n.9, p. e284, 2005.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MURALI MANOAR, B.; NAGINI, S. Of humans and canines: A comparative evaluation of Heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinical Chemical Acta**, v. 365, p. 168-76, 2006a.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; BALACHANDRAN, C.; MURALI MANOAR, B.; THANGADURAI, A.; NAGINI, S. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumours. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 364-68, 2006b.

LO, M.; YIP, T.; NGAN, K. et al. Role of MIF/CXCL8/CXCR2 signaling in growth of nasopharyngeal carcinoma tumor spheres. **Cancer Letters**. v. 335, p. 81-92. 2013.

MAHMOUD, S.M.A.; PAISH, E.C.; POWE, D.G.; MACMILLAN, R.D.; GRAINGE, M.J.; LEE, A.H.S.; ELLIS, I.O.; GREEN, A.R. Tumor-Infiltrating CD8 Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v.29, n.15, p. 1949-1955. 2011.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, p. 344–346. 2005.

MÉNÉTRIÉ-CAUX, C.; GOBERT, M.; CAUX, C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. **American Association for Cancer Research**. V.69, n. 20, p. 7895-98, 2009.

MERLO, A; CASALINI, P; CARCANGIU, ML; MALVENTANO, C; TRIULZI,T; MENARD, S; TAGLIABUE, E; BALSARI, A. FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. V. 27, p.1746-52, 2009.

MITO, K.; KIKUYA SUGIURA, K.; KANA UEDA, K. et al. IFN γ markedly cooperates with intratumoral dendritic cell vaccine in dog tumor models. **Cancer Research**. v.70, n.18, p.7093-7101. 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0600.

ODA, S.; ODA, T.; NISHI, K. et al. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. **PLOS ONE**. V. 3, n.5, p.1-11, 2008.

O'NEILL, K.; GUTH, A.; BILLER, B.; ELMSLIE, R.; DOW, S. Changes in regulatory T cells in dog with cancer and associations with tumor type. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 23, p. 875-881. 2009. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0333.x.

PEROU, C.M.; JEFFREY, S.S.; VAN DE RIJN, M. et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 9212-9217. 1999.

RASOTTO, R.; GOLDSCHMIDT, M.H.; CASTAGNARO, M.; CARNIER, P.; CALIARI, D.; ZAPULLI, V. The dogs as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. **Journal Comparative Pathology**. v.151, p. 166-80. 2014.

REED, M.J. The discriminant-function test: a marker of Th1/Th2 cell cytokine secretion and breast tumour oestrogen synthesis. **Molecular Medicine Today**, v.1, p.98-103. 1995.

REOME, J.B.; HYLIND, J.C.; DUTTON, R.W.; DOBRZANSKI, M.J. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast cancer. **Clinical Immunology**, v. 111, p. 69-81. 2004. doi:10.1016/j.clim.2003.11.013.

RISSETO, K.C.; INDT, H.; SELTING, K.A.; VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; REINERO, C.R. Cloning and expression of canine CD25 for validation of an anti-human CD25 antibody to compare T regulatory lymphocytes in healthy dogs and dogs with osteosarcoma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, p.137-145. 2010.

ROSOLEM, M. C. Relação entre o infiltrado inflamatório e as células dendríticas na resposta imune aos carcinomas do tipo simples em mama de cadelas. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, "Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho"**, Jaboticabal, 2013.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumours. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 25-34, 2002.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **Biomedical Central Veterinary Research**. V.6, n.5 p. 1-9, 2010. Acesso em <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/5>.

SATYAM, A.; SINGH, P.; BADJATIA, N.; SETH, A.; SHARMA, A. A disproportion of TH1/TH2 cytokines with predominance of TH2 in urothelial carcinoma of bladder. **Urologic Oncology**, v. 29, n.1, p. 58-65. 2011. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.06.002.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A.; RUBINO, L. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**. v. 18, n.5, p.349-55. 2008. Doi: 10.1016/j.semcan.2008.03.004.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunology Letters**. v. 123, p. 97-102. 2009.

STANDISH, L. J.; SWEET, E. S.; NOVACK, J. et al. Breast cancer and immune system. **Journal of Society of Integrative Oncology**., v.6, n.4, p. 158-68. 2008.

SUFFNER, J.; HOCHWELLER, K.; KÜHNLE, M. et al. Dendritic cells support homeostatic expansion of FoxP3+ regulatory T cells in FoxP3.luciDTR mice. **The Journal of Immunology**. v. 184, p.1810-20, 2010.

TÖPFER, K.; KEMPE, S.; MÜLLER, N.; SCHMITZ, M.; BACHMANN, M.; CARTELLIERI, M.; SCHACKERT, G.; TEMME, A. Tumor Evasion from T Cell Surveillance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 1-19. 2011. doi:10.1155/2011/918471.

VERJANS, E.; NOETZEL, E.; BEKTAS, N. et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *Biomedical Central Cancer*. V. 9, p. 230-48, 2009.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**. v. 27, p. 5904-5912, 2008.

YAMAZAKI, K.; YANO, T.; KAMEYAMA, T.; SUEMITSU, R.; YOSHINO, I.; SUGIO, K. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery*, v.131, p. S236-41. 2002. Doi: 10.1067/msy.2002.119795.

YADDANAPUDI, K.; PUTTY, K.; RENDON, B.E.; LAMONT, G.J.; FAUGHN J.D.; SATOSKAR, A.; LASNIK, A.; EATON, J.W.; MITCHELL, R.A. Control of Tumor-Associated Macrophage Alternative Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor. **The Journal of Immunology**. v.190, p. 2984-93. 2013.Doi: 10.4049/jimmunol.1201650.

ZHANG, W.J.; LI, B.H.; YANG, X.Z. et al. IL-4-induced Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells. **Cytokine**, v. 42, p. 39–47. 2008. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.016.