

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

Câmpus de Jaboticabal

**RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E OS
LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS CANINAS**

Mayara Caroline Rosolem

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

Câmpus de Jaboticabal

**RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E OS
LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS EM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS CANINAS**

Mayara Caroline Rosolem

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Geórgia Modé Magalhães

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 (Patologia Veterinária).

2017

R822r Rosolem, Mayara Caroline
Relação entre as células dendríticas e os linfócitos T regulatórios em neoplasias mamárias caninas / Mayara Caroline Rosolem. -- Jaboticabal, 2017
xvii, 63 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Bárbara Cristina Mazzucatto, Hélio José Montassier, Marcela Marcondes Pinto Rodrigues, Pamela Rodrigues Reina Moreira
Bibliografia

1. Células apresentadoras de antígeno. 2.imunidade. 3.neoplasia mamária. 4. Cão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

e-mail: mayara_rosolem@yahoo.com.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E OS LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

AUTORA: MAYARA CAROLINE ROSOLEM

ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

COORIENTADORA: GEÓRGIA MODÊ MAGALHÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARCELA MARCONDES PINTO RODRIGUES
Centro Veterinário de Diagnóstico Anátomo- Patológico e Biologia Molecular / Cevepat - Botucatu/SP



Pós-doutoranda PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. BARBARA CRISTINA MAZZUCATTO
Departamento de Medicina Veterinária / Universidade Estadual de Maringá / Umuarama/PR

Jaboticabal, 16 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MAYARA CAROLINE ROSOLEM – nascida em oito de dezembro de 1987, natural da cidade de Araruna, estado do Paraná. Iniciou sua graduação no curso de Medicina Veterinária em janeiro de 2005, na Faculdade Integrado de Campo Mourão (PR), tendo finalizado a mesma em dezembro de 2009. cursou o programa de aprimoramento profissional na área de Patologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), da Universidade Estadual Paulista - Unesp, Câmpus de Araçatuba/SP, sob a orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Daniela Bernadete Rozza, de janeiro de 2010 a janeiro de 2011. Ainda no ano de 2011, ingressou no programa de pós-graduação (mestrado) em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, sob a orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, tendo-o concluído em outubro de 2013. Em março de 2014 ingressou novamente no programa de pós-graduação (doutorado) em Medicina Veterinária da mesma instituição, novamente sob a orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Desde fevereiro de 2016 é docente e responsável pela disciplina de Patologia Especial Veterinária da Faculdade Dr. Francisco Maeda – FAFRAM, localizada em Ituverava, SP, onde permanece lecionando e prestando serviços de citopatologia e necropsia para a instituição e região.

***“É preciso que eu suporte duas ou três larvas
Se quiser conhecer as borboletas.”***

(O pequeno Príncipe - Antoine de Saint-Exupéry)

***Este trabalho é dedicado ao meu velho Floock (Lobo), o
“nascido com sorte”.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir viver mais este dia.

Ao meu pai, Elio (Nino) e minha mãe Terezinha (Neguinha). Minha fonte de amor infinito, de proteção. Obrigada por todo apoio, toda a força, por sempre acreditarem em mim!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por também ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de finalizar mais esta etapa da minha escadinha profissional.

À professora Geórgia Modé Magalhães, que me co-orientou neste trabalho e me acompanha desde as épocas de estágio curricular.

Aos meus amores eternos! Mingau, Apolo, Biscuit, Pequininho, Rex, Cissa, Maya (todos *in memoriam*) e meu velho Lobo, Tussi, Fumaça, Babaloo, Gaia, Sushi e Amorinha. Olhar e lembrar de vocês faz sorrir meu coração.

À minha amiga Marcela Rubio, por ter aguentado minhas oscilações de humor, e por ter estado ao meu lado durante todo o doutorado. E por me ajudar a cuidar da gatolândia.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Andresa Matsui, Pamela Moreira, Paulo Leal, Priscila Preve e Tatiana Frate por todo suporte técnico, emocional e fraternal! Por todo companheirismo e carinho. Por todos os conselhos, dados e recebidos, por tudo. Tudo mesmo.

Aos meus amigos do Departamento de Patologia e de vida! Adriana Almeida, Andrey Itajahy, Anny Stupinãn, Branca Rochidali, Claudia Momo, Diego Batista, Fernanda Barbosa, Gabriela Piovam, Janine Denadai, Juliana de Oliveira, Júlio Hough, Lucas Bocchini, Mayara Luzzi e à todos que, de alguma forma, compartilharam comigo seus conhecimentos, choros, risadas, momentos de alegria, de desespero e, óbvio, de comilanças infinitas!

Aos meus queridos alunos da FAFRAM. Vocês são minha motivação, meu gás!

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Patologia Veterinária desta instituição, em especial à Mabel Custódio e Francisca de Assis Ardison, pela colaboração e carinho.

Ao Departamento de Patologia Veterinária desta Instituição, por ter sido minha segunda casa e que me ofereceu todo suporte técnico necessário para a realização deste trabalho.

Ao Serviço de Oncologia (SOV) e o Serviço de Reprodução e Obstetrícia (SORA) desta Instituição, pelo atendimento clínico e cirúrgico dos animais que participaram deste trabalho.

As cadelas que participaram desse projeto e seus proprietários. Meu mais profundo obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro fornecido a esta pesquisa (2011/03510-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos.

Obrigada, obrigada e MUITÍSSIMO OBRIGADA! ☺

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)..	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xii
LISTAS DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 A neoplasia em cadelas.....	19
2.2 Células dendríticas.....	21
2.3 Fisiologia do processamento e apresentação antigênica.....	24
2.4 A apresentação antigênica diante de um microambiente tumoral.....	25
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Seleção das amostras.....	32
4.2. Análise imunohistoquímica.....	33
4.3. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	55
8. REFERÊNCIAS.....	56



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009019/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Relação entre as células dendríticas e os linfócitos T regulatórios em carcinomas mamários caninos"**, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Rosemeri de Oliveira Vasconcelos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de junho de 2014.

Jaboticabal, 06 de junho de 2014.


Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS DENDRÍTICAS E OS LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

RESUMO – Os tumores mamários malignos possuem várias formas de evadir o sistema imune e, dentre elas está a modulação das células dendríticas (DCs), por interferência na sua maturação, resultando em apresentação de antígenos ineficiente aos linfócitos T e consequente indução da tolerância imunológica. As DCs moduladas pelo tumor recrutam muitos linfócitos T regulatórios (Tregs) para o microambiente tumoral, o que amplia os efeitos imunossupressores locais. A forte relação entre as DCs e os linfócitos Tregs no microambiente tumoral ainda foi pouco estudada, principalmente em cães. Por isso, este estudo teve o objetivo de avaliar a relação existente entre as DCs e os linfócitos Tregs em carcinomas mamários caninos do tipo simples de cadelas, por meio da técnica de imunohistoquímica. Foram utilizadas 10 amostras de glândula mamária sem tumor (G1) e 40 amostras de neoplasias mamárias (G2: adenomas; G3: carcinomas papilares; G4: carcinomas tubulares e G5: carcinomas sólidos), que foram submetidas a imunodeteção de linfócitos Treg (FOXP3⁺), linfócitos T CD4 e T CD8, MHC-II, DCs mieloides (imaturas e maduras), as citocinas TGF- β , IL-10, a enzima Indoleamine 2,3-dioxigenase (IDO) e dos receptores de quimiocina (CCR6 e CCR7). A maioria das células, citocinas e receptores imunológicos mostraram correlação positiva dentro da população tumoral e controles avaliados, principalmente sobre o efeito fixo “idade”, que teve alta correlação positiva com o tamanho tumoral e com CCR6. Quanto às correlações negativas, o anticorpo CD83 foi o único que não teve correlação significativa positiva com nenhuma outra variável. Observou-se que houve ocorrência de relação entre as DCs mieloides imaturas/maduras e linfócitos Tregs, bem como TGF- β e IL-10, e a enzima IDO apresentaram marcante presença nas amostras malignas. A imunodeteção de CCR6 e CCR7 ocorreu principalmente nos tumores mais agressivos, onde CCR6 teve alta relação com as pacientes mais idosas e com tumores maiores, o que, no final de tudo pode refletir que o envelhecimento do sistema imunológico possa ser mais um fator pró-tumoral.

Palavras-chave: células apresentadoras de antígeno, tumor de mama, cadelas, células regulatórias, imunossupressão, microambiente.

RELATIONSHIP BETWEEN DENDRITIC CELLS AND REGULATORY T CELLS IN CANINE MAMMARY TUMOR

ABSTRACT – The malignant mammary tumors have several ways of evading the immune system, including the modulation of dendritic cells (DCs), by interfering with their maturation, resulting in inefficient presentation of antigens to T cells and consequent induction of immunological tolerance. Tumor-modulated DCs recruit many regulatory T cells (Tregs) into the tumor microenvironment, which amplifies local immunosuppressive effects. The strong relationship between DCs and Tregs cells into the tumor microenvironment was poorly studied, especially in dogs. Therefore, this study aimed to evaluate the relationship between DCs and Tregs cells in the simple type canine mammary carcinomas, using the immunohistochemical technique. Ten samples of mammary gland without tumor (G1) and 40 samples of mammary neoplasms (G2: adenomas, G3: papillary carcinomas, G4: tubular carcinomas and G5: solid carcinomas) were submitted to immunodetection of Treg cells (FOXP3 +), CD4 and CD8 T cells, MHC-II, myeloid DCs (immature and mature), cytokines TGF- β , IL-10, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and chemokine receptors (CCR6 and CCR7). Most of the cells, cytokines and immunological receptors showed positive correlation within the tumor population and controls evaluated, mainly on the fixed effect "age" that had high positive correlation with the tumor size and with CCR6. As for the negative correlations, the CD83 antibody was the only one that had no significant positive correlation with any other variable. It was observed that there was a relationship between immature / mature myeloid DCs and Tregs cells, as well as TGF- β and IL-10, and the IDO enzyme showed a marked presence in the malignant samples. Immunodetection of CCR6 and CCR7 occurred mainly in the most aggressive tumors, where CCR6 had a high relation with older patients and with larger tumors, which, in the end, may reflect that the aging of the immune system may be more of a pro- tumor.

KEYWORDS: antigen presenting cells, mammary gland tumor, female dogs, regulatory cells, immunosuppression, microenvironment.

LISTA DE ABREVIÇÕES

APC's	Células apresentadoras de antígeno
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (agrupamento de diferenciação)
CD4	Agrupamento de diferenciação dos linfócitos T CD4, é um receptor específico de moléculas de MHC-II
CD8	Agrupamento de diferenciação dos linfócitos TCD8, é um receptor específico para moléculas de MHC-I
CD10	Antígeno superfície de células progenitoras linfoides B imaturas
CD11c	Integrina αX de membrana presente em células dendríticas imaturas
CD34+	Glicoproteína que medeia a ligação de células-tronco hematopoéticas à matriz extracelular
CD40	Molécula co-estimulatória marcadora de superfície de células dendríticas maduras
CD80	Molécula co-estimulatória marcadora de superfície de células dendríticas maduras
CD83	Molécula co-estimulatória marcadora de superfície de células dendríticas maduras
CD86	Molécula co-estimulatória marcadora de superfície de células dendríticas maduras
CCR6	Receptor de CCL20 (também denominado de MIP3- α)
CCR7	Receptor de ELC (também denominado de MIP3- β)
CTL	linfócitos T citotóxicos
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
DC's	Células dendríticas
Flt3	Receptor tirosino-quinase 3 Fms-relacionado, atua na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular
FOXP3	Fator de transcrição <i>forkhead 3</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
HE	Coloração de hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

IDO	Enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
LAG-3	Molécula de superfície celular expressa em linfócitos T e B efetores, células NK e células dendríticas plasmocitoides
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MIP3-α	Proteína inflamatória macrófágica 3 alfa
MIP3-β	Proteína inflamatória macrófágica 3 beta
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade principal de classe I
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe II
NK	Células <i>natural killers</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
p63	Marcador Nuclear Seletivo de Células Mioepiteliais da Mama Humana
TCR	Receptor de linfócitos T efetores
Treg	Linfócitos T regulatórios
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
Th2	Resposta de linfócito T <i>helper</i> do tipo 2
TICD	Células dendríticas infiltrantes do tumor
TLR	Receptores tipo <i>Toll</i>
TRIS EDTA	Tampão para recuperação antigênica de pH básico
TRIS HCL	Tampão para lavagem de pH neutro
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio vascular
VEGF-C	Fator de crescimento derivado do endotélio vascular C

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição das amostras de tecido mamário canino com e sem tumor nos grupos, considerando os graus histológicos de malignidade.....	33
Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para imunohistoquímica nas mamas de cadela com tumores malignos, benignos e sem tumor.....	36
Tabela 3. Tabela descritiva que mostra as médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos gerais observados para todas as variáveis propostas.....	43
Tabela 4. Determinação do coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis físicas (grupo, idade e tamanho tumoral) e as variáveis imunológicas (CD4, CD8, CD11c, CD83, FOXP3, IL-10, enzima IDO, TGF- β , CCR6 e CCR7) em tecido mamário canino dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5.....	44
Tabela 5. Tabela da análise multivariada de Pillai, mostrando a influência das variáveis “grupo”, “idade”, e “estágio TNM” influenciaram as variáveis imunológicas.....	45
Tabela 6. Correlação estabelecida para as funções discriminantes das variáveis originais do tecido mamário canino.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Resumo do ciclo de <i>feedback</i> homeostático entre DCs e Treg. O aumento do número de DCs resulta no aumento do número de células T reg. Um aumento do número de linfócitos T reg conduz a uma diminuição em DCs, que por sua vez diminui o número de linfócitos T reg, que em seguida aumenta o número de DCs. A expressão de MHC-II pelas DCs é necessária para esses efeitos <i>in vivo</i>. A perda de linfócitos T reg aumenta DCs por um mecanismo que requer o Flt3.....</p>	28
<p>Figura 2. Fotomicrografias das imunomarcações em linfonodo canino, controles positivo. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de linfócitos T CD4, barra 20 µm (detalhe: 40x). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) para linfócitos T CD8, barra = 20 µm (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.....</p>	35
<p>Figura 3. Fotomicrografias das imunomarcações das DCs mieloides em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de DCs imaturas (anti-CD11c) em meio ao infiltrado inflamatório de um carcinoma tubular grau I (grupo G4, barra = 50 µm). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) das DCs maduras (anti-CD83) em região peritumoral de um carcinoma tubular grau I (Grupo G3; barra = 20 µm).....</p>	38
<p>Figura 4. Fotomicrografias do tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática no infiltrado inflamatório e nas células tumorais (detalhe) de MHC-II em um carcinoma papilar grau I (grupo G3). (B) Marcação nuclear (detalhe) para linfócito Treg em um carcinoma tubular grau III (grupo G4). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Barra = 50 µm.....</p>	39
<p>Figura 5. Fotomicrografias das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de linfócitos T CD4 no infiltrado inflamatório peritumoral de um carcinoma papilar grau II (grupo G3). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) para linfócitos TCD8 em carcinoma tubular grau I (grupo G4). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Barra = 20 µm.....</p>	40
<p>Figura 6. Fotomicrografias das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação da enzima IDO no infiltrado inflamatório peritumoral de um carcinoma papilar grau II (grupo G3, detalhe). (B) Células inflamatórias e endoteliais positivas para IL-10 em um carcinoma papilar grau II (grupo G3). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Barra = 20 µm.....</p>	41

- Figura 7.** Fotomicrografia da imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor para $TGF\beta$ (marcação citoplasmática no detalhe) em infiltrado inflamatório peritumoral de um carcinoma tubular grau I (grupo G4). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Barra = 100 μm 41
- Figura 8.** Fotomicrografia das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação de CCR6 (detalhe) em infiltrado inflamatório peritumoral de um carcinoma tubular grau I (grupo G4). (B) Marcação positiva para CCR7 em meio ao infiltrado inflamatório de um carcinoma tubular grau I (grupo G4). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. Barra = 20 μm 42
- Figura 9.** Médias padronizadas por grupo das variáveis idade, tamanho do tumor, imunomarcação de linfócitos Treg, IL-10, CCR6 e CCR7 nas mamas com e sem tumor de cadelas..... 46
- Figura 10.** Representação gráfica discriminante por grupo (função discriminante 1) e por malignidade tumoral (função discriminante 2)..... 47

1. INTRODUÇÃO

O estudo dos diversos tipos de tumores na medicina e as suas respectivas ações sobre o organismo para driblar as defesas impostas pelo hospedeiro são o foco de muitos estudos, que datam do século passado (TEIXEIRA e FONSECA, 2007). Na medicina veterinária, a neoplasia mamária tem grande importância, devido a sua elevada frequência na espécie canina. A glândula mamária é alvo do desenvolvimento de tumores em virtude da variedade de tipos celulares e que potencialmente são susceptíveis a sofrer mutações e originar diferentes tipos de tumores. Dada a essa relevância, as neoplasias em tecido mamário são continuamente estudadas, a fim de se compreender os mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como os meios de evasão destes tumores (DE NARDI et al, 2002; OLIVEIRA, 2003).

Apesar dos esforços em estudar a relação entre o sistema imune e o câncer, a sua biologia ainda não está elucidada, pois existem inúmeros mecanismos de evasão tumoral que dificultam a resposta imune adequada para eliminar o tumor (ABBAS, LITCHTMAN, PILLAI, 2015). Um dos principais responsáveis pela evasão imune dos tumores são as células dendríticas (DCs), que podem sofrer interferência em sua maturação, resultando em tolerância imunológica, devido a ineficiente capacidade de apresentar antígenos e ativar os linfócitos T (STEINMAN, 2012).

As DCs são consideradas as mais eficientes células apresentadoras de antígeno, pois funcionam como uma “ponte” entre as respostas imunes inata e adquirida. Estas células multifuncionais atuam como sentinelas em praticamente todos os órgãos. Após a sua ativação, desencadeada por uma resposta inflamatória, contato direto com patógenos ou com um tumor, elas processam fragmentos antigênicos e migram para os órgãos linfoides periféricos. Nesta fase elas tornam-se maduras e capazes de apresentar antígenos para os linfócitos T (ABBAS, LITCHTMAN, PILLAI, 2015).

Atualmente, as DCs se tornaram um grande alvo de pesquisas, seja por sua atuação dentro do sistema imune, bem como pelo seu uso nos tratamentos imunoterápicos (STEINMAN, 2012). Muitos estudos são fundamentados na pesquisa das DCs em diferentes tecidos e até mesmo em tumores de diversas espécies de

animais. Para o entendimento do papel das DCs, deve-se considerar também a sua relação com os linfócitos T regulatórios (Tregs). Estas células possuem um efeito imunossupressor e poderiam ser consideradas, em alguns tipos de neoplasias malignas, ótimas aliadas na progressão tumoral, juntamente com as DCs (SAKAGUCHI et al, 2010).

Atualmente, não há registros de estudos que descrevem a relação destas duas populações celulares na resposta imunológica em tumores mamários em cães. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi avaliar se há uma conexão de equilíbrio visível entre as células dendríticas e os linfócitos T regulatórios no microambiente de neoplasias mamárias caninas, além de avaliar a presença destas duas populações celulares com a malignidade destes tumores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 A neoplasia mamária em cadelas

A neoplasia de glândula mamária é comumente diagnosticada na rotina de médicos veterinários por todo o mundo (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007; SALAS et al., 2015). Todo este aumento significativo no diagnóstico deste tipo de neoplasias pode ser justificado pelo aumento da expectativa de vida dos animais atualmente e pela maior eficiência nos métodos de diagnóstico clínico nos pacientes (NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017). Adicionalmente, os tutores de animais de companhia estão mais atentos quanto à saúde de seus pets e buscam mais precocemente a avaliação do médico veterinário, e estes devem estar informados quanto a estudos e novidades no diagnóstico e tratamento envolvendo esta doença (DE NARDI, RAPOSO-FERREIRA, ASSUNÇÃO, 2016). O tumor de mama é considerado o tipo de neoplasia mais diagnosticada em cadelas (MISDORP, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002; ZATLOUKAL et al., 2005; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007; DE NARDI, RAPOSO-FERREIRA, ASSUNÇÃO, 2016; NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017).

Os tumores mamários não apresentam predisposição racial, porém há um maior risco para animais de raças puras (DALECK et al., 1998). Os machos também podem desenvolver este tumor, porém sua ocorrência é rara. As fêmeas de meia idade a idosas são as mais acometidas (com idade média de nove anos). Cerca de 70 a 90% dos casos diagnosticados no Brasil correspondem a neoplasias malignas (DE NARDI, RAPOSO-FERREIRA, ASSUNÇÃO, 2016; NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias (torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais) (CARVALHO, 2006). A grande parte dos tumores ocorrem nas mamas abdominais e inguinais (QUEIROGA; LOPES, 2002). A razão desta ocorrência não é clara, mas pode estar relacionada a maior proporção de parênquima mamário nestes locais e conseqüentemente maior exposição do tecido mamário a ação hormonal (MOULTON, 1990; CARVALHO, 2006; NUNES; CAMPOS; BERTAGNOLLI, 2017).

A etiologia do tumor mamário canino, assim como de qualquer neoplasia, é multifatorial. Alterações genéticas, influências hormonais, nutricionais e ambientais já foram associadas ao surgimento de neoplasias nas mamas desta espécie (DE NARDI et al., 2002; MISDORP, 2002; TORÍBIO et al., 2012; DE NARDI, RAPOSO-FERREIRA, ASSUNÇÃO, 2016). A alimentação caseira composta por carne de origem bovina e suína, assim como a obesidade no primeiro ano de vida são fatores importantes que podem predispor ao surgimento do tumor. Quanto à influência hormonal, há a hipótese de que a presença de receptores hormonais em células de tumores de mama auxiliam no crescimento tumoral, como o estrógeno e progesterona, principalmente quando de origem exógena (CARVALHO, 2006; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007; DE NARDI, RAPOSO-FERREIRA, ASSUNÇÃO, 2016).

O diagnóstico definitivo do tipo de neoplasia mamária é realizado pela avaliação microscópica, por intermédio das análises citológica e histopatológica. A citologia possibilita avaliar o tipo celular e verificar sua origem, além de auxiliar no descarte de outras causas como mastite, lactação, ou até mesmo outros tumores, como os de pele (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001). A análise histopatológica permite avaliar a arquitetura tecidual, inspecionar as margens cirúrgicas, observar características de malignidade e invasão (FELICIANO et al., 2012), assim como, verificar linfonodos, vasos sanguíneos e linfáticos (MORRISON; De NICOLA, 1993).

A classificação histológica usada em medicina veterinária não é consensual. Têm sido utilizados diferentes sistemas para classificar microscopicamente as neofomações mamárias caninas, de forma a prever o seu comportamento (MISDORP, 1999; GOLDSCHIMIDT et al., 2011; CASSALI et al, 2014). O mais recente consenso para classificação histológica das neoplasias mamárias caninas é o de Cassali et al. (2014), que se baseou em Misdorp et al. (1999) e que propôs alguns novos critérios, a fim de estabelecer um padrão para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da neoplasia mamária canina. Esta classificação mais atual foi adotada como referência neste estudo por se tratar de um consenso nacional e que teve por objetivo padronizar os critérios de avaliação deste tipo de neoplasia no Brasil.

2. 2 Células dendríticas

O interesse em investigar a relação entre o sistema imune, as células tumorais e seu microambiente é crescente e a cada dia surgem novas pesquisas que buscam ilustrar os mecanismos envolvidos no complexo processo do escape tumoral. De acordo com a literatura, para que um grupo de células neoplásicas seja eliminado é necessário que haja o envolvimento das imunidades inata e adaptativa, o que forma um grande sistema integrado de defesa no hospedeiro, no qual diversas células e moléculas atuam mutuamente (MATIAS, 2010). A resposta inata é composta pelas barreiras físicas e químicas, fagócitos, células *natural killer* (NK) e citocinas, enquanto que a resposta imune adaptativa é mediada basicamente pelos linfócitos T, que são os responsáveis em desenvolver mecanismos efetores capazes de eliminar as células tumorais (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; CRUVINEL et al., 2010). O linfócitos T são importantes no contexto de defesa contra o desenvolvimento de neoplasias, por este fato são alvo da evasão tumoral, pela indução da tolerância imunológica (KRATHWOHL; SCHACKER; ANDERSON, 2006).

Na primeira metade do século 20, os imunologistas ainda buscavam compreender a relação entre os antígenos e os linfócitos. Somente em meados da década de 1960 foi que um terceiro elemento, denominado "*novel cells*" (novas células) e posteriormente de células dendríticas (DCs), foi descrito e inserido neste contexto imunológico, elucidando melhor a relação antígeno-linfócitos (STEINMAN, 2012).

As DCs já haviam sido descritas na pele humana por Paul Langerhans, no ano de 1868. No entanto, a sua função era totalmente desconhecida e somente na década de 1970 que os pesquisadores Ralph Steinman e Zanvil Cohn identificaram essa nova população celular no baço de camundongos. Assim deu-se início os primeiros estudos com as DCs, para compreender o seu papel na imunidade. Recentemente, o seu potencial imunoterápico tem sido vastamente investigado (HART, 1997; MALDONADO-LÓPEZ; MOSER, 2001; JOLLES, 2002; WIEDER, 2003).

As DCs tiveram mais destaque ainda quando verificou-se que elas participam ativamente do processo de rejeição à transplantes. Muitos fatores contribuíram para

dificultar a compreensão das funções das DCs, tais como a escassez de marcadores específicos, a dificuldade em distingui-las de monócitos e macrófagos, bem como os problemas envolvendo as técnicas de purificação. Os estudos sugeriram que as DCs pertencem à uma população rara de leucócitos, com complexa heterogeneidade fenotípica e funcional, especializadas em processar e apresentar antígenos, dando início à resposta imune inata e adaptativa dos linfócitos T (HART, 1997; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; KAH-WAI et al., 2006). Somente na década de 1980, as DCs foram finalmente consideradas células apresentadoras de antígenos (APCs). Estas células são altamente eficientes na captura, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T e B (WIEDER, 2003; KAH-WAI et al., 2006). Expressam elevado nível de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), moléculas co-estimulatórias e moléculas adesivas, um pré-requisito para a ativação de linfócitos T (KAH-WAI et al., 2006).

A ativação dos linfócitos T depende diretamente da intervenção das DCs, pois os linfócitos T somente reconhecem um antígeno se este for apresentado por uma APC. Por essa razão, as DCs são consideradas um ligante fundamental entre as imunidades inata e a adaptativa (CRUVINEL et al., 2010), onde os receptores de antígenos presentes nos linfócitos T (TCR) reconhecem os fragmentos de antígenos apresentados pelas DCs, ligados a moléculas de MHC, tanto de classe I quanto de classe II, as quais estimulam os linfócitos T citotóxicos (CTLs) e os linfócitos T auxiliares, respectivamente. Ademais, as DCs também expressam moléculas co-estimulatórias para interagir com os receptores TCR dos linfócitos T e auxiliar no reconhecimento antigênico pelos mesmos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

As DCs podem ser classificadas de acordo com sua origem, localização anatômica e estágio de maturação (BANCHEREAU et al., 2000). Existem diferentes subpopulações de DCs, com características fenotípicas únicas e funcionais encontradas em diferentes locais (ARDAVÍN et al., 2001). Elas são oriundas de células pluripotentes CD34+ presentes na medula óssea e se diferenciam em duas vias principais: a via mieloide e a via linfoide. Esta última aparece numa proporção menor no organismo, quando comparada à primeira (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; GOGOLÁK et al., 2003; CRUVINEL et al., 2010; MATIAS, 2010). Estas linhagens são diferenciadas pelo marcador mieloide CD11c. As DCs mieloides

possuem marcação CD11c+/CD123-, enquanto as linfoides são CD11c-/CD123+ (PULENDRAN et al., 1999). Quanto à sua localização, as DCs são classificadas em epidérmicas (células de Langerhans), circulantes (presentes na circulação sanguínea), intersticiais (presentes no interstício de órgãos não linfoides) e as interdigitantes (presentes nos órgãos linfoides) (THOMAS; LIPSKY, 1996).

As DCs ainda são subdivididas de acordo com seu estágio de maturação, em imaturas, maduras e semi-maduras (LUTZ; SCHULER, 2002). Uma importante característica funcional das DCs imaturas é a sua capacidade de realizar endocitose, mecanismo que sozinho não é capaz de transformá-las em maduras (LUTZ; SCHULER, 2002). As DCs maduras são caracterizadas por apresentarem numerosos processos citoplasmáticos que se estendem, a partir do corpo principal da célula (semelhante aos dendritos dos neurônios). Elas ainda contém abundante estruturas intracelulares relacionadas ao processamento de antígenos, incluindo endossomas, lisossomas e grânulos de Birbeck (presentes nas células de Langerhans epidermais). Além disso, expressam altos níveis de MHC-II e moléculas co-estimulatórias (WIEDER, 2003).

As DCs semi-maduras são observadas apenas em situações patológicas. Quando migram para os linfonodos e induzem tolerância nos linfócitos T, ao invés de imunidade. Para um amadurecimento completo da DC, é necessária a presença de um antígeno fortemente imunogênico, bem como um sinal químico de “invasão”, ou seja, a presença de quimiocinas atrativas e a ativação dos receptores de moléculas co-estimulatórias (que ficam nas DCs). A principal diferença entre as DCs semi-maduras das maduras é que apenas as maduras secretam citocinas (especialmente as interleucinas IL-12 e IL-6), que levam a promoção de uma resposta efetora de linfócitos T. Assim como acontece com as DCs imaturas, as interações entre as semi-maduras e os linfócitos T resultam no desenvolvimento de tolerância aos antígenos apresentados (KRATHWOHL et al., 2006).

As DCs são decisivas para a determinação da ativação e do tipo de imunidade mediada pelos linfócitos T. Em geral, DCs semi-maduras são tolerogênicas, enquanto DCs maduras são imunoestimuladoras (CRUVINEL et al., 2010). Um estudo realizado por Krathwohl, Schacker e Anderson (2006) levantou a hipótese de que o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) em humanos induz um estado de semi-maturação

nas DCs que acabam por se acumularem nos linfonodos, induzindo a tolerância imunológica.

2.3 Fisiologia do processamento e apresentação antigênica

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T *in vivo* (KRATHWOHL et al., 2006). Os linfócitos T virgens apresentam uma propriedade peculiar, denominada de restrição pelo MHC, que significa que eles somente reconhecem um antígeno peptídico se estiver ligado ao MHC das APCs, dando início a resposta imune mediada pelos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015).

De uma forma geral, as células precursoras das DCs circulam no sangue na sua forma inativa para subsequentemente, darem origem as DCs imaturas que residem nos tecidos periféricos (KAH-WAI et al., 2006; WANG et al., 2007). Perante um estímulo antigênico, as DCs deixam a medula óssea para chegarem ao local da injúria e se tornarem imaturas, onde passarão a apresentar grande capacidade de capturar/processar antígenos e baixa habilidade em estimular linfócitos T virgens (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015; MATIAS, 2010). Estas células chegam rapidamente ao local de injúria, precedendo até mesmo os neutrófilos (CRUVINEL et al., 2010). Ao mesmo tempo, a presença dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) estimulam as reações da imunidade inata e ligam-se aos receptores TLRs das DCs, assim como das células epiteliais e de macrófagos residentes no tecido injuriado. Consequentemente ocorre a produção de citocinas e a sinalização direta via TLR, ativando as DCs que então passam por diversas alterações fenotípicas e funcionais (GOGOLÁK et al., 2003; KAH-WAI et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015).

As DCs ativadas expressam receptores de superfície específicos para quimiocinas produzidas nas áreas povoadas por linfócitos T, dentro dos órgãos linfoides. As quimiocinas MIP3- α e MIP3- β estimulam as DCs a saírem do local da injúria e seguirem para os linfonodos, por meio dos vasos linfáticos. Durante essa migração, as DCs amadurecem, passando de células captadoras de antígenos para

células estimuladoras de linfócitos T virgens. Com o amadurecimento há o aumento na síntese e na expressão estável de moléculas co-estimulatórias (CD40, CD58, CD80 e CD86), necessárias para a estimulação dos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os fragmentos dos antígenos oriundos de microrganismos ou de proteínas tumorais são apresentados aos linfócitos T e associados as moléculas de MHC de classe II. Já os antígenos citosólicos, que são proteínas produzidas no citoplasma de células infectadas por vírus, são apresentados aos linfócitos T pelo MHC de classe I. Essas duas vias de processamento antigênico envolvem organelas e proteínas diferentes. São projetadas para capturar amostras de todas as proteínas presentes nos ambientes extracelular e intracelular. A segregação das vias de processamento também garante que diferentes subtipos de linfócitos T reconheçam antígenos de compartimentos diferentes (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015).

Após os linfócitos T entrarem em contato com as DCs, que carregam o antígeno até o linfonodo, os mesmos tornam-se linfócitos T efetores. Em resposta a esse conjunto de reações, citocinas são liberadas para estimularem a proliferação de linfócitos T específicos para responder ao antígeno (expansão clonal), que irá influenciar diversos grupos de células T. Uma parte destes linfócitos sofre processo de diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos T efetores; outro grupo de linfócitos T permanece no linfonodo, eliminando as células infectadas ou fornecendo sinais para os linfócitos B; alguns linfócitos T deixam o linfonodo e partem em direção ao local injuriado, onde são capazes de erradicar o antígeno. Outro grupo prolifera em resposta ao antígeno e se torna linfócito T de memória. O estímulo de diferenciação dos linfócitos cessa após a eliminação completa do agente agressor (ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015).

2.4 A apresentação antigênica diante de um microambiente tumoral

O processo inflamatório crônico é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de tumores e foi somente no final do século 20 que surgiram

evidências sobre seu papel na tumorigênese. A distinção entre inflamação pró e anti-tumoral ainda não está clara, pois muitas citocinas e células do sistema imune exercem duplo papel (GRIVENNIKOV et al., 2010; CHOW, MÖLLER, SMYTH, 2012). Células inflamatórias como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos, células dendríticas, células *natural killers*, linfócitos T, B e T regulatórios secretam fatores solúveis que medeiam o desenvolvimento do processo inflamatório associado aos tumores, muito embora outras células (incluindo a células cancerígenas) também participem ativamente deste processo (WU e CHEN, 2013; ROSOLEM et al., 2017).

A maturação das DCs é um dos pontos de controle existentes dentro da resposta imunológica e a sua falha funcional, por influência de um tumor maligno e a manutenção de um meio inflamatório adequado, resulta em evasão tumoral do sistema imune (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006; ROSOLEM et al., 2017), com conseqüente indução da tolerância imunológica pelo não reconhecimento dos fragmentos de antígeno tumoral pelos linfócitos T virgens (KRATHWOHL; SCHACKER; ANDERSON, 2006). Os tumores, além de serem pobremente imunogênicos, possuem a capacidade de produzir citocinas e quimiocinas e outros fatores (IL-10, TGF- β , MIP3- α , VEGF, M-CSF, IL-6, GM-CSF, IL-10 e gangliosídeos), que inibem e modulam o funcionamento das DCs, mantendo-as no fenótipo imaturo, além de recrutarem e ativarem a participação de linfócitos T regulatórios (T regs) para o microambiente tumoral (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006; BRAZ-SILVA, 2009; CUNHA, et al., 2014).

A plasticidade das DCs permite que as mesmas mudem seu fenótipo em resposta a fatores quimiotáticos oriundos de uma resposta fisiológica ou do microambiente tumoral. Em alguns tumores com presença de DCs imaturas e de linfócitos Treg imunossupressores, demonstram a capacidade do tumor de evadir defesas imunológicas. As citocinas associadas ao tumor podem influenciar no fenótipo das DCs (CUNHA et al., 2014).

As DCs semi-maturas ou as imaturas induzem a resposta imunológica dos Treg. Como conseqüência, há diminuição de DCs maduras e funcionalmente competentes e o aumento de DCs imaturas circulantes. A diminuição do número de DCs maduras leva a incapacidade de iniciar a resposta imune específica contra o

tumor. A predominância de DCs imaturas induz ao quadro de tolerância dos linfócitos T (GABRILOVICH, 2004; KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

Estudos com neoplasias em humanos e camundongos mostram que os tumores são capazes de recrutar DCs imaturas para o sítio tumoral e influenciarem no seu amadurecimento (BELL et al., 1999; GABRILOVICH, 2004; KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006, ROSOLEM, 2013), bem como utilizam os mecanismos de tolerância periférica, responsáveis em controlar a autoimunidade (BRAZ-SILVA, 2009), com a promoção da proliferação dos linfócitos Treg e conseqüentemente a supressão da resposta imune anti-tumoral. Assim, a influência tumoral direta sobre os linfócitos Treg e as DCs resulta em supressão da resposta imune específica (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006; BRAZ-SILVA, 2009; FERNANDES, 2013; RAMOS et al, 2013).

De acordo com Darrasse-Jeze e colaboradores (2009), existe uma relação forte de equilíbrio fisiológico entre as DCs e os linfócitos T regs, observada em camundongos. O desequilíbrio entre DCs e os linfócitos Treg acontece em virtude de um mecanismo de *feedback*. Quando os Treg estão em depleção, há um aumento compensatório da Flt3 (tiosino-quinase 3 Fms-relacionado), um receptor tiosino quinase que atua na sobrevivência, proliferação e diferenciação celulares. Esse fato leva a um aumento compensatória de DCs. Já a diminuição de DCs culmina com uma perda de linfócitos Treg e/ou uma expressão diminuída de Foxp3 (fator nuclear) nestas células. O aumento do número de DCs leva a aumento de Treg associado a maior expressão de MHC de classe II nas DCs (DARRASSE-JEZE et al., 2009; MALDONADO, VON ANDRIAN, 2010). Darrasse-Jeze et al. (2009) ainda descreveram que o número de Treg é diretamente proporcional ao número de DCs *in vivo* em camundongos (Figura 1).

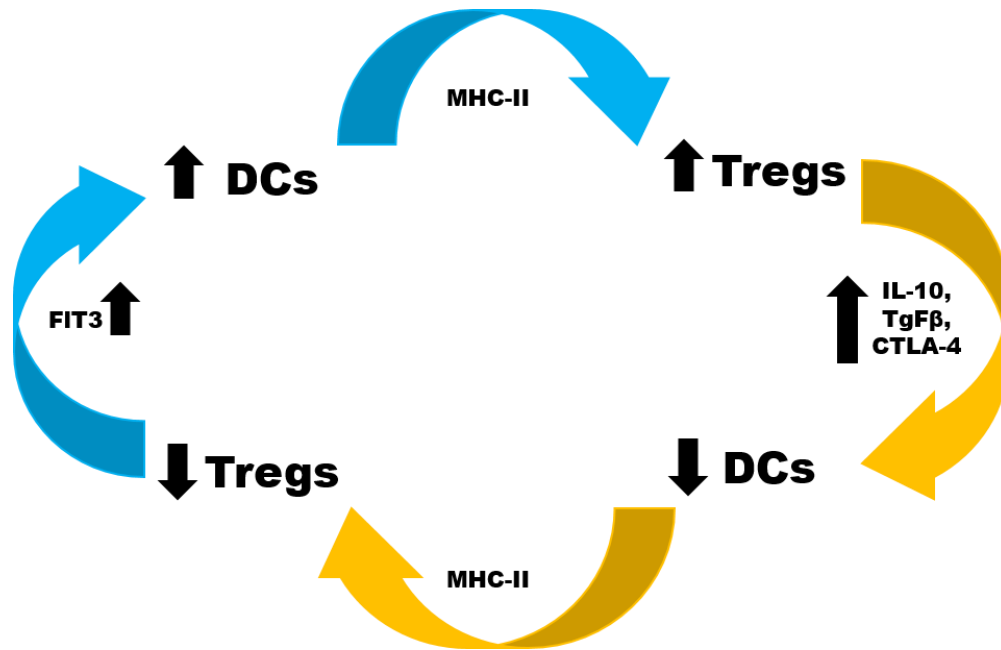


Figura 1. Resumo do ciclo de *feedback* homeostático entre DCs e Treg. O aumento do número de DCs resulta no aumento do número de células T reg. Um aumento do número de linfócitos T reg conduz a uma diminuição em DCs, que por sua vez diminui o número de linfócitos T reg, que em seguida aumenta o número de DCs. A expressão de MHC-II pelas DCs é necessária para esses efeitos *in vivo*. A perda de linfócitos T reg aumenta DCs por um mecanismo que requer o Flt3 (Adaptado de DARRASSE-JEZE et al., 2009).

Legenda: CTLA-4 (proteína citotóxica associada ao linfócito T-4); IL-10 (interleucina 10); TGFβ (fator de transformação do crescimento beta); Flt3 (Tiosino-quinase 3 Fms-relacionado); MHC-II (complexo de histocompatibilidade maior de classe 2).

No microambiente tumoral, os linfócitos Treg podem ser estimulados a proliferar, por interferência direta do tumor ou das DCs. Sendo assim, as DCs também são indutoras de Treg dentro do microambiente tumoral (DARRASSE-JEZE et al., 2009; RAMOS, et al., 2013), mas estes mecanismos ainda não foram totalmente elucidados na espécie canina (MALDONADO, VON ANDRIAN, 2010; RAMOS et al., 2013).

Os efeitos imunossupressores dos linfócitos Treg ocorrem por ação direta de IL-10, TGF-β, MIP3-α; por citólise (secreção de granzimas e perforinas, o que lhes compete um efeito citotóxico), pela supressão por disfunção metabólica e pela inibição da maturação das DCs imaturas (BRAZ-SILVA, 2009). Uma das formas de influência dos linfócitos Tregs sobre as DCs se dá pela interferência na maturação das DCs, através da liberação da enzima indoleamina 2,3 – dioxygenase (IDO), que é estimulada por IFN-γ (BRANDACHER et al., 2006; FERDINANDE, et al., 2012) e pela

interação entre o CTLA-4 e as moléculas co-estimulatórias (CAMPBELL, 2015). AIDO causa a diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias nas DCs, por um mecanismo dependente da ligação à proteína de superfície CTLA-4 às moléculas co-estimulatórias (SHALEV, et al., 2011; WING; SAKAGUCHI, 2012). A enzimaIDO é responsável também pelo catabolismo do triptofano e pela depleção deste aminoácido, acarretando uma queda na produção de metabólitos pró-apoptóticos. A superexpressão daIDO já foi descrita em tumores mamários em mulheres (SOLIMAN et al., 2013). Além disso, IL-10 e TGF- β produzidas por linfócitos Treg modulam negativamente a expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86/CD83), CD40 e IL-2 em DCs, interferindo na ativação dos linfócitos T. Ademais, a molécula LAG-3, expressa em linfócitos Treg, ao se ligar ao MHC-II nas DCs, inibe a maturação e função das DCs (FERNANDES, 2013; ABBAS; LICHTMAN, PILLAI, 2015).

As diferentes subpopulações de DCs exibem sensibilidade única à quimiocinas específicas, que as atraem e encaminham ao sítio inflamatório/tumoral. As DCs mieloides imaturas expressam o receptor CCR6, cujo ligante é MIP-3 α (LARC, Exodus-1), que orienta a migração das DCs imaturas até o sítio tumoral. Após a maturação, as DCs expressam o receptor CCR7 e adquirem a capacidade de resposta a MIP-3 β (ELC, Exodus 3). Desta forma, as DCs deixam os tecidos injuriados e entram no fluxo linfático, dirigidas por MIP-3 β , que é expresso em vasos linfáticos e na região paracortical dos linfonodos (BANCHEREAU et al., 2000).

Tudo o que foi descrito representa o quanto as DCs e os linfócitos Treg estão conectados. Atualmente, a pesquisa envolvendo as DCs, os linfócitos Treg e a expressão de citocinas dentro do microambiente tumoral está mais bem definida em seres humanos e camundongos. Poucos ensaios clínicos foram publicados envolvendo a espécie canina e a principal explicação para tal se deve as limitadas informações sobre as DCs caninas *in vivo* (WIEDER, 2003; MIELCAREK et al., 2007; QESKAA, BAUMGÄRTNERA, BEINEKEA, 2013). A descoberta das DCs e dos linfócitos Treg são eventos de 10 a 15 anos, aproximadamente (QUEIROGA; LOPES, 2002; ZATLOUKAL et al., 2005; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007), mas o entendimento do comportamento dessas populações celulares nas neoplasias caninas, principalmente nas mamas, ainda não foi completamente esclarecido. Assim, a realização deste estudo tem por finalidade tentar desvendar um pouco mais

as correlações entre estas duas populações celulares, sob a influência direta do comportamento mais agressivo do tumor.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar se há uma relação entre o número de células dendríticas (imaturas e maduras) e os de linfócitos T regulatórios no microambiente de neoplasias mamárias caninas.

Objetivos específicos:

- Identificar a população e o posicionamento das células dendríticas mieloides imaturas (CD11c⁺) e maduras (CD83⁺) e de linfócitos T regulatórios (FOXP3⁺) dentro das neoplasias mamárias do tipo simples em cadelas por meio de imunohistoquímica;
- Identificar a população e o posicionamento de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e de MHC-II nas neoplasias mamárias por meio de imunohistoquímica;
- Identificar a presença de células expressando citocinas regulatórias (TGF- β , IL-10 e a enzima IDO), por meio da imunohistoquímica;
- Identificar a presença dos receptores de quimiocinas que atuem na migração de DCs imaturas (CCR6) e de DCs maduras (CCR7) nas neoplasias mamárias por meio de imunohistoquímica;
- Verificar a associação entre todos os marcadores propostos dentro das neoplasias de mama do tipo simples em cadelas e correlacioná-los com a malignidade tumoral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras

Neste estudo foram utilizadas 40 amostras de mama de cadelas com tumores mamários malignos e benignos, provenientes de 31 cadelas, sem predileção por raça ou idade. Foram utilizados mais de um tumor proveniente de uma mesma cadela, que apresentaram mais de um tumor na mesma cadeia mamária, porém de tipos histológicos diferentes. As cadelas foram atendidas pelos Serviços de Oncologia e o de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV – Unesp, no período de 2011 a 2013. Os animais foram submetidos a triagem clínica e encaminhados para o procedimento cirúrgico (mastectomia radical unilateral), sob anestesia geral inalatória, de acordo com todas as normas de bem-estar animal. Destes animais foram selecionadas as amostras que se enquadraram dentro do tipo histológico proposto para o estudo (carcinoma mamário do tipo simples, dos subtipos papilar, tubular e sólido). Os linfonodos inguinais (n=31) avaliados foram submetidos as análises histopatológicas para a identificação de micrometástases.

Amostras de glândulas mamárias híginas (n=10) foram obtidas de cadelas necropsiadas no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – Unesp, que formaram o grupo controle (sem tumor). Os animais selecionados para o grupo controle eram livres de doenças sistêmicas ou de neoplasias. Foram utilizados mais de uma mama controle proveniente de um mesmo animal.

As 50 amostras de tecido mamário utilizadas neste estudo foram distribuídas em quatro grupos: G1 (10 mamas sem neoplasia, grupo controle), G2 (10 adenomas), G3 (10 carcinomas papilares), G4 (10 carcinomas tubulares) e G5 (10 carcinomas sólidos). Para todos os carcinomas foram selecionadas amostras representativas dos diferentes tipos histológicos relacionados ao “carcinoma simples” (tabela 1). Os tumores mistos e outros tipos de sarcomas foram excluídos do estudo devido à grande heterogeneidade que estes tumores apresentam.

Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética sobre o uso de animais da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal (CEUA 009019/14).

Tabela 1. Distribuição das amostras de tecido mamário canino com e sem tumor nos grupos, considerando os graus histológicos de malignidade.

Grupos	Tipo Histológico*	Benignidade/Malignidade**	Total
G1	Controle	-	10
G2	Adenomas	-	10
G3	Carcinoma papilar	1	5
		2	5
G4	Carcinoma tubular	1	6
		2	2
		3	2
G5	Carcinoma sólido	2	4
		3	6
TOTAL			50

Legenda: classificação histopatológica* de acordo com CASSALI et al. (2014) e graduação** por Elston e Elis (1998)

Todas as amostras obtidas foram avaliadas macroscopicamente, considerando-se as dimensões do tumor e sua relação com o tecido adjacente e com o linfonodo inguinal. Após a clivagem das mamas, estas foram fixadas em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4), por 24 horas. Posteriormente, as mesmas foram processadas até a inclusão em parafina, cortadas em micrótomo na espessura de 5µm e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Todas as amostras tumorais dos grupos G2, G3, G4 e G5 foram classificadas de acordo com Cassali et al. (2014) e o grau de malignidade foi baseado em Elston e Elis (1998). Os parâmetros utilizados para a análise microscópica foram a relação do tumor com o tecido adjacente (infiltração, presença de êmbolos tumorais intravasculares), o padrão histológico do tumor (formação tubular, papilar ou sólida), aspectos celulares (anisocariose, cariomegalia), índice mitótico e presença de metástase em linfonodos regionais. Quanto a presença de micrometástases, somente dois linfonodos a apresentaram, oriundos de duas fêmeas que tiveram o histotipo sólido no diagnóstico microscópico.

4.2 Análise Imunohistoquímica

Os fragmentos de tecido mamário foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para a detecção de subpopulações de linfócitos Treg, T CD4, T

CD8, de células dendríticas mieloides imaturas (CD11c) e maduras (CD83), de MHC-II, das citocinas IL-10 e TGF β , da enzima IDO, dos receptores de quimiocina CCR6 e CCR7 (tabela 2).

De uma forma geral, os protocolos de imunohistoquímica para os diferentes anticorpos foram constituídos por desparafinização das lâminas em estufa (60°C) por uma hora e em seguida a imersão da lâminas em xilol (20 min). Após as lâminas foram hidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool até a lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi feita pelo calor (tabela 2). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se produto comercial (Hydrogen Peroxide Block, Spring, cód. DHP125), por 30 min ou com solução de metanol e água oxigenada a 10%, por 30 min, protegido da luz. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi duplo, com produto comercial (Protein Block, Dako, cód. X0909, por 1 hora), seguido de incubação com solução de leite em pó desnatado diluído em água destilada a 8%, por 1 hora, ambos em câmara escura. O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina, Dako, cód. K3468-1), por 3 min. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Entre cada passo foram realizadas lavagens dos cortes com solução tampão de TRIS HCl, pH 7,4 / 5 min e água destilada / 5 min.

Os controles positivos utilizados para todos os anticorpos foi linfonodo de cão (Figura 2). Para os controles negativos, utilizou-se o diluente de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Dako, cod. S3022) em substituição ao anticorpo primário.

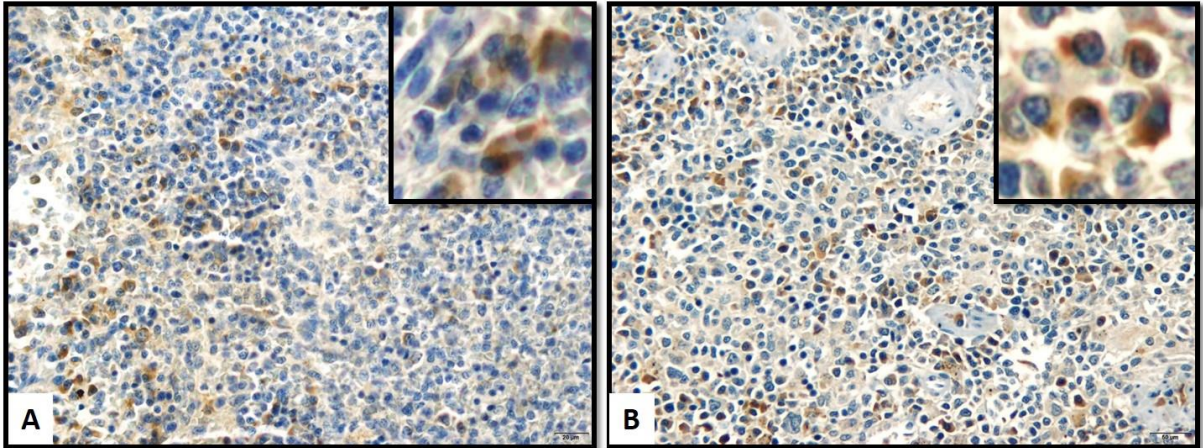


Figura 2. Fotomicrografias das imunomarcações em linfonodo canino, controles positivo. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de linfócitos T CD4, barra 20 μm (detalhe: 40x). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) para linfócitos T CD8, barra = 20 μm (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

A densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada pela contagem das células nas áreas da mama que apresentaram maior imunomarcação (*hot spot*), em cinco campos de grande aumento (obj. 40x, área=0,032 μm^2) (ROSOLEM et al., 2015), em microscópio de luz (Nikon, E200). As imagens capturadas foram analisados pelo software Cell Sens Standars Olympus Corporation (versão 1.9, 2009-2013).

Tabela 2. Descrição dos anticorpos utilizados para imunohistoquímica nas mamas caninas com e sem tumores.

Anticorpos/ Marca/Código	Clones	Tipo celular marcado	Recuperação Antigênica	Diluição	Incubação/ temperatura	Conjugado	Bloqueio peroxidase
Anti-FOXP3 (goat polyclonal) Biorbyt (orb18370)	-	Linfócitos Treg	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:2000	2h/temp. ambiente	LSAB ³ (Dako)	HPB ⁶
Anti-CD4 (mouse anti-dog) Bio-Rad (MCA1998S)	CA13.1E4	Linfócitos TCD4	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:150	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	HPB ⁷
Anti-CD8 (mouse anti-dog) Bio-Rad (MCA1999S)	CA9.JD3	Linfócitos TCD8	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:100	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	HPB ⁷
Anti-CD11c (mouse anti-dog) Novus Biologicals (NB100-65291)	CA11.6A1	DCs mieloides imaturas	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:25	24h/temp. ambiente	Advance ⁵ (Dako)	M+P ⁸
Anti-CD83 (mouse anti-human) Abcam (ab49324)	1H4b	DCs mieloides maduras	Banho-maria (95° C – 30 min), Citrato ²	1:100	18h/4° C	Advance ⁵ (Dako)	M+P ⁹
Anti-HLA-DR (mouse anti-human) Dako (M0746)	TAL.1B5	Células expressando MHC-II	Banho-maria (95° C – 30 min), Citrato ²	1:500	18h/4° C	Advance ⁵ (Dako)	M+P ⁹
Anti-IL-10 (rabbit polyclonal) Biorbyt (orb100193)	-	Células expressando IL-10	Câmara de pressão Pascal (Dako), Citrato ²	1:500	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	HPB ⁶
Anti-TGF- β (rabbit polyclonal) Santa Cruz (SC-146)	-	Células expressando TGF- β	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:400	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	HPB ⁷
Anti-IDO (rabbit polyclonal) Biorbyt (orb18370)	-	Células expressando a enzima IDO	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:100	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	HPB ⁶
Anti-CCR6 (rabbit polyclonal) Abcam (ab78429)	-	Receptores CCR6 (de MIP3- α)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:500	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	M+P ⁹
Anti-CCR7 (rabbit polyclonal) Abcam (ab140758)	-	Receptores CCR7 (de MIP3- β)	Câmara de pressão Pascal (Dako), TRIS EDTA ¹	1:100	18h/4° C	HRP ⁴ (Spring)	M+P ⁹

Legenda: 1- Tampão para recuperação antigênica de pH 9,0; 2- tampão para recuperação antigênica de pH 6,0; 3- Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690-1); 4- Kit HRP complexo de polímeros ligados a peroxidase (Spring, cód. DHP125); 5- Kit Advance HRP® (Dako Cytomation, código K406889-2); 6- Hydrogen peroxidase block (Spring, cód. DHP125) aplicada antes do anticorpo primário; 7- Hydrogen peroxidase block (Spring, cód. DHP125) aplicada depois do anticorpo primário; 8- Metanol + peróxido de hidrogênio, 10%, aplicada depois do anticorpo primário; 9- Metanol + peróxido de hidrogênio, 10%, aplicado antes do anticorpo primário.

4.3 Análise estatística

As contagens das imunomarcações das variáveis imunológicas (CD11c, CD83, MHC-II, FOXP3, CD4, CD8, enzima IDO, IL-10, TGF-B, CCR6 e CCR7) foram submetidas à análises estatísticas descritivas, de correlação e multivariadas. Análises de correlação de Pearson foram realizadas para estudo da relação entre as contagens das imunomarcações dos diferentes anticorpos e os efeitos fixos que foram controlados (grupo, idade dos animais e tamanho do tumor). Análise multivariada discriminante foi realizada para identificar os possíveis fatores que poderiam ser considerados na separação dos grupos. Assim, as variáveis foram padronizadas para a distribuição normal Z (média zero e desvio-padrão um). Correlações entre as funções discriminantes e as variáveis acima (abaixo) de 0,60 (-0,60) foram consideradas importantes para discriminar os grupos dentro da função. Teste multivariado de Pillai ($P < 0,05$) foi utilizado para verificar a influência global dos efeitos de grupo, idade dos animais e tamanho do tumor sobre as contagens das imunomarcações dos diferentes anticorpos. Em adição, análise do perfil dos grupos de tumores foi realizada com base nas médias padronizadas das variáveis que foram correlacionadas com o efeito de grupo. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2017).

5. RESULTADOS

A imunomarcção do anticorpo anti-CD11c para detecção das DCs mieloides imaturas foi observada no citoplasma das células. No G1 (controles), as imunomarcções estavam distribuídas pelo mioepitélio, adjacente à glândula mamária. No grupos G2 (adenomas), G3 (papilares) e G4 (tubulares) as células positivas foram observadas no parênquima tumoral e, principalmente, em meio ao infiltrado inflamatório (figura 3A). No G5 (sólidos) as células imunomarcadas se encontravam ao redor do tumor (peritumoral).

A imunomarcção de DCs mieloides maduras também foi citoplasmática. Em G1, ao redor dos ácinos e no mioepitélio. Em G2 (adenomas), G4 (tubulares) e G5 (sólidos), a marcação foi observada no estroma tumoral. Em G3 (papilares), estavam presentes no infiltrado inflamatório e aleatoriamente no estroma tumoral (figura 3B).

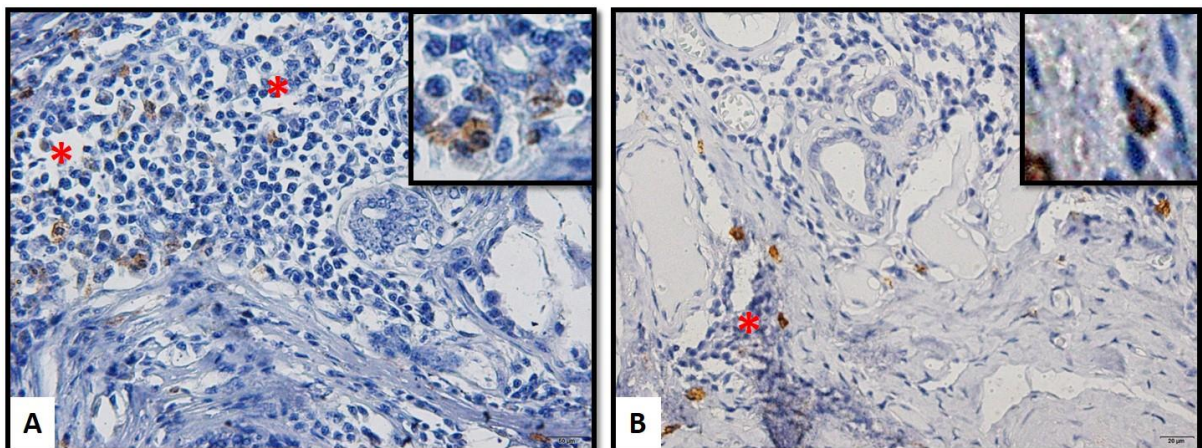


Figura 3. Fotomicrografias das imunomarcções das DCs mieloides em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de DCs imaturas (CD11c) em meio ao infiltrado inflamatório (*) de um carcinoma tubular grau I (G4, barra = 50 µm) (detalhe: 40x). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) das DCs maduras (CD83) em região peritumoral (*) de um carcinoma tubular grau I (G3; barra = 20 µm) (detalhe: 40x). Complexo de polímero ligado a peroxidase.

A imunodeteção de MHC-II foi observada no citoplasma de células do infiltrado inflamatório (linfócitos, plasmócitos, macrófagos) (Figura 4A), além das próprias células tumorais. No grupo G1 (controles) as imunomarcções estavam distribuídas aleatoriamente pelo epitélio mamário. Nos grupos G2 (adenomas) e G3 (papilares), as células imunomarcadas foram observadas no infiltrado inflamatório e no mioepitélio

(figura 2A). Nos grupos G4 (tubulares) e G5 (sólidos), as células com marcação positiva foram observadas no estroma tumoral, nas células tumorais e no infiltrado inflamatório.

Os linfócitos Treg tiveram marcação nuclear para todos os grupos (figura 4B). Em G1 (controles) e G2 (adenomas), a presença de células imunomarcadas para FOXP3 foi reduzida e localizada somente ao redor das células epiteliais. Em G3 (papilares), a marcação foi predominante no infiltrado inflamatório peritumoral. Em G4 (tubulares) a mesma foi observada no parênquima tumoral, relacionada ao infiltrado inflamatório e as células tumorais. Em G5 (sólidos) a detecção de FOXP3 ocorreu no infiltrado inflamatório e na região peritumoral.

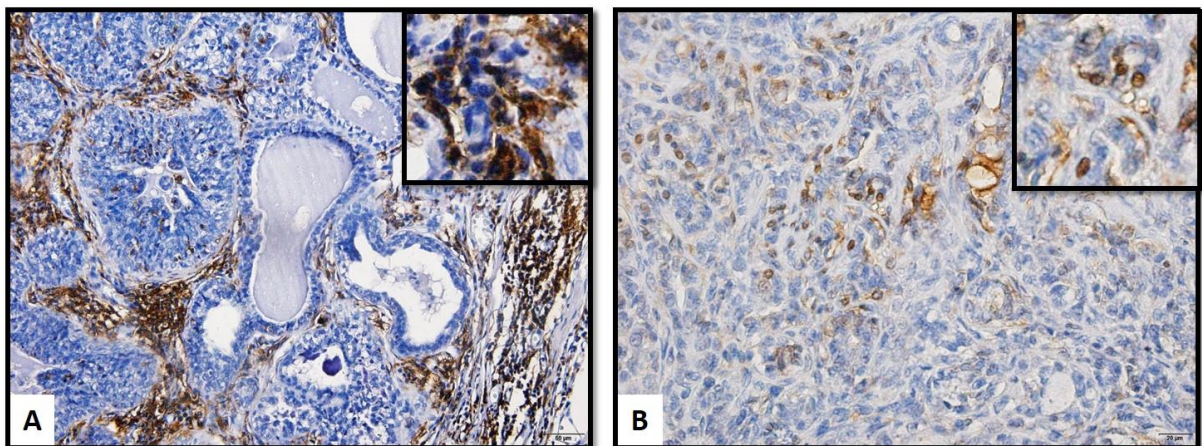


Figura 4. Fotomicrografias do tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática no infiltrado inflamatório e nas células tumorais (detalhe) de MHC-II em um carcinoma papilar grau I (G3) (Complexo de polímero ligado a peroxidase). Barra = 50 µm (detalhe: 40x). (B) Marcação nuclear (detalhe) para linfócito Treg em um carcinoma tubular grau III (G4). Barra = 20 µm (detalhe: 40x). Estreptavidina Biotina Peroxidase;

Os linfócitos T auxiliares (CD4) foram observados próximos ao epitélio mamário (G1 - controles e G2 – adenomas), em menor densidade celular. Em G3 (papilares), no mioepitélio das papilas e no infiltrado inflamatório. Em G4 (tubulares), estas células foram detectadas na região peritumoral, no infiltrado inflamatório (figura 5A) e entremeada às células tumorais. Em G5 (sólidos), células CD4 positivas apareceram no infiltrado intratumoral.

Os linfócitos T citotóxicos (CD8 / figura 5B) foram observados em todos os grupos, no infiltrado inflamatório. No entanto, em G3 (papilares) predominaram na região peritumoral, em G5 (sólidos) a marcação foi identificada nas próprias células

tumorais. Em G2 (adenomas) e G4 (tubulares) houve marcação tumoral e peritumoral. Em G1 (controles) poucas células estavam imunomarcadas distribuídas aleatoriamente pela glândula mamária.

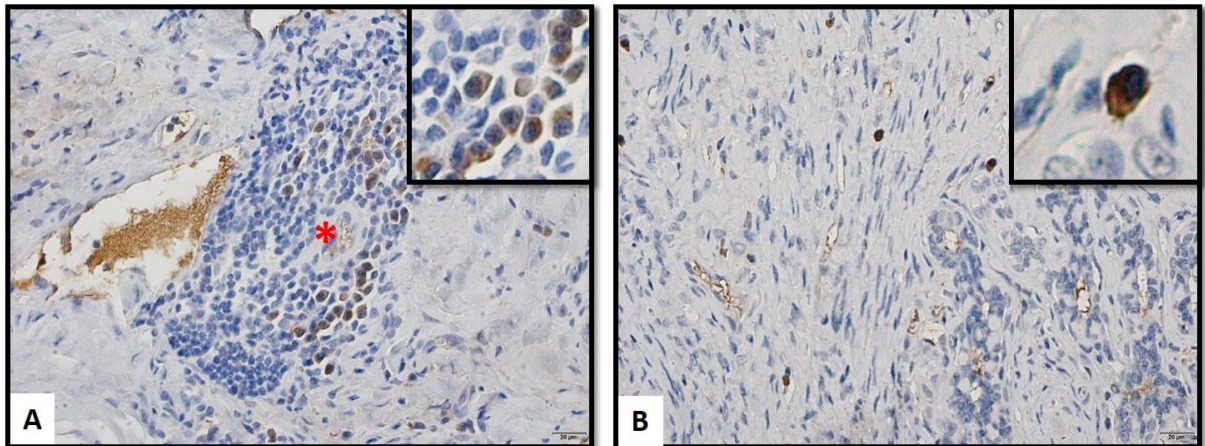


Figura 5. Fotomicrografias das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação citoplasmática (detalhe) de linfócitos T CD4 no infiltrado inflamatório (*) peritumoral de um carcinoma papilar grau II (G3). Barra 20 µm (detalhe: 40x). (B) Marcação citoplasmática (detalhe) para linfócitos TCD8 em carcinoma tubular grau I (G4). Barra = 20 µm (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

A enzima Indoleamine 2,3-dyoxigenase (anti-IDO) foi detectada no citoplasma das células (figura 6A). Em G1 (controles), a marcação ocorreu em células próximas às células epiteliais. Em G2 (adenomas) e G3 (papilares) verificou-se apenas no infiltrado inflamatório. Em G4 (tubulares), a localização da marcação foi em meio ao estroma tumoral, principalmente em linfócitos, plasmócitos e nas células mioepiteliais. Em G5 (sólidos), a mesma foi escassa em linfócitos, plasmócitos e na região peritumoral.

Para a interleucina 10 (IL-10), a marcação foi citoplasmática (figura 6B, detalhe), sendo que em G2 (adenomas) a marcação foi somente no infiltrado inflamatório peritumoral; em G3 (papilares) e G5 (sólidos), no infiltrado inflamatório peritumoral e também nas células tumorais; em G4 (tubulares) a mesma foi observada no estroma tumoral.

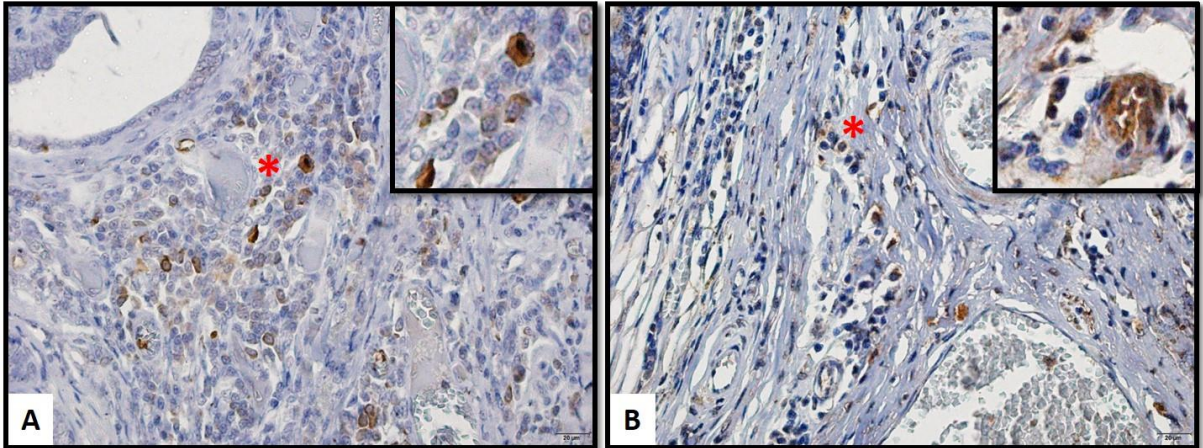


Figura 6. Fotomicrografias das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação da enzima IDO no infiltrado inflamatório (*) peritumoral de um carcinoma papilar grau II (G3, detalhe) Barra: 20 µm (detalhe: 40x). (B) Células inflamatórias e endoteliais (*) positivas para IL-10 em um carcinoma papilar grau II (G3). Barra = 20 µm (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

O fator de transformação de crescimento beta ($TGF-\beta$) teve marcação citoplasmática (figura 7). Para G1 e G2, a marcação foi evidente somente em discretos focos de infiltrado inflamatório associados a mama. Em G3, G4 e G5 as células imunomarcadas foram macrófagos e linfócitos, distribuídos nos infiltrados intra e peritumorais.

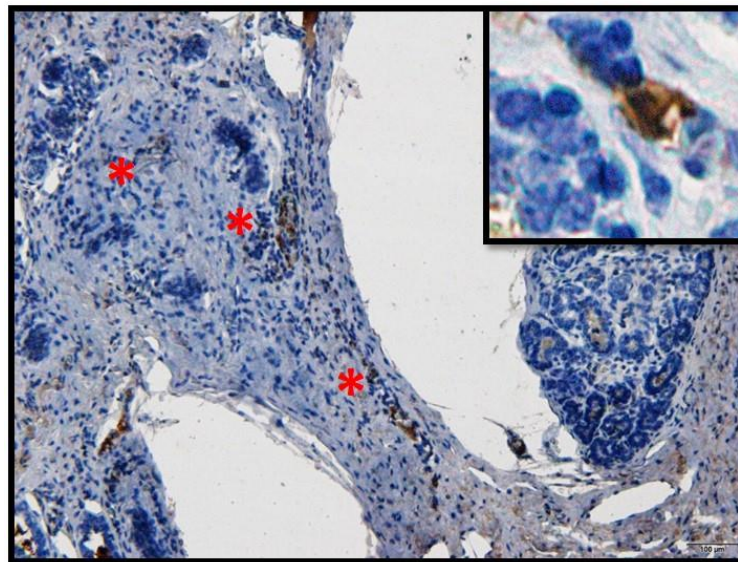


Figura 7. Fotomicrografia da imunomarcação em tecido mamário de cadelas com tumor para $TGF\beta$ (marcação citoplasmática no detalhe) em infiltrado inflamatório (*) peritumoral de um carcinoma tubular grau I (G4). Barra = 100 µm. (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

Para os receptores das quimiocinas MIP3- α (CCR6) e MIP3- β (CCR7), as marcações foram citoplasmáticas (figuras 8A e 8B, respectivamente). Em G1 (controles), G2 (adenomas), G4 (tubulares) e G5 (sólidos) a imunodeteção do CCR6 ocorreu no infiltrado inflamatório e nas células tumorais; em G3 (papilares), foi observado no infiltrado inflamatório intratumoral. A imunodeteção do CCR7 foi predominante no estroma tumoral e no infiltrado inflamatório nos grupos G3 (papilares), G4 (tubulares) e G5 (sólidos). Em G2 (adenomas) foi possível ainda observar marcação de endotélio de vasos linfáticos. Em G3 (papilares) houve marcação também ao redor do tumor. G1 apresentou marcação aleatória (menor) em células inflamatórias.

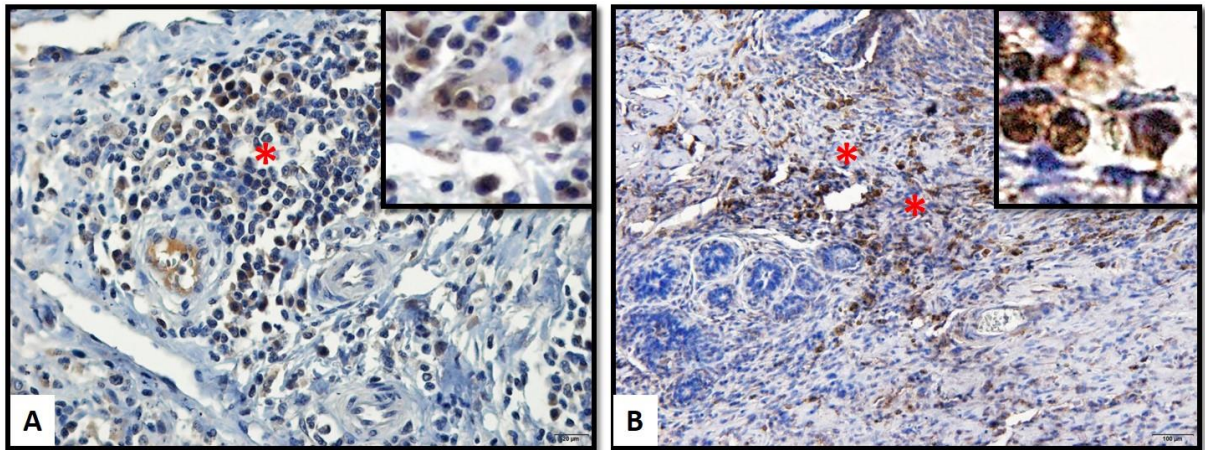


Figura 8. Fotomicrografia das imunomarcações em tecido mamário de cadelas com tumor. (A) Marcação de CCR6 (detalhe) em infiltrado inflamatório (*) peritumoral de um carcinoma tubular grau I (grupo G4) Barra: 20 μ m (detalhe: 40x). (B) Marcação positiva para CCR7 em meio ao infiltrado inflamatório (*) de um carcinoma tubular grau I (grupo G4). Barra = 20 μ m (detalhe: 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

As cadelas com tumor deste estudo tiveram idade média de 10,5 anos (variação entre seis e 16 anos). As médias de cada variável referentes a idade, tamanho do tumor e as imunomarcações estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Tabela descritiva que mostra as médias, desvio padrão, valores mínimos e máximos gerais das contagens de células imunomarcadas observados de todas as variáveis propostas (fixas e imunológicas).

Variáveis	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade*	10,54	2,65	10,0	6,0	16,0
Tamanho*	2,64	2,22	1,4	0,4	9,0
CD4	7,00	8,58	4,8	0,0	48,8
CD8	7,59	12,22	3,4	0,0	51,8
CD11c	2,51	2,35	1,8	0,0	8,6
CD83	2,47	1,91	2,0	0,0	8,2
FOXP3	3,20	3,79	2,0	0,0	15,4
IL-10	38,61	73,59	21,2	0,0	469,4
IDO	2,73	4,39	1,4	0,0	25,8
MHC-II	60,88	56,53	50,4	1,8	263,6
TGF-β	3,54	4,12	2,6	0,0	19,6
CCR6	4,96	6,19	2,8	0,0	25,8
CCR7	6,03	6,70	3,6	0,0	28,2

Legenda: CD4: marcador de linfócitos T *helper*. CD8: Marcador de linfócitos T citotóxicos. CD11c: marcador de células dendríticas mieloides imaturas. CD83: marcador de células dendríticas mieloides maduras. FoxP3: fator de transcrição para linfócitos T regulatórios. IL-10: marcador de interleucina 10. IDO: marcador da enzima indolamina 2,3-dioxigenase. MHC-II: marcador de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II. TGF- β : marcador de fator de transformação do crescimento beta. CCR6: marcador de receptor da quimiocina MIP-3 α . CCR7: marcador de receptor da quimiocina MIP-3 β .

* Para as categorias "idade" e "tamanho", não foi incluído o G1 (grupo controle).

A análise de correlação de Pearson demonstrou que a maioria das variáveis imunológicas tiveram correlações positivas médias e fortes dentro das populações de mamas avaliadas. Observa-se as seguintes correlações positivas demonstradas na tabela 4. O CD83 foi o único que não apresentou diferenças significativas entre as correlações com as demais variáveis, porém foi a única que apresentou correlação negativa e fraca (todas as informações acima citadas estão detalhadas na tabela 4).

Tabela 4. Determinação do coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis físicas (grupo, idade e tamanho tumoral) e as variáveis imunológicas (CD4, CD8, CD11c, CD83, FOXP3, IL-10, enzima IDO, TGF- β , CCR6 e CCR7) em tecido mamário canino dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5.

Grupo	1.00														
Idade	0.70	1.00													
Tamanho	0.50	0.48	1.00												
CD4	N	N	0.30	1.00											
CD8	N	N	N	N	1.00										
CD11c	N	N	N	0.36	0.45	1.00									
CD83	N	N	N	N	N	N	1.00								
FOXP3	0.34	N	N	N	N	N	N	1.00							
IL-10	0.29	N	N	N	N	N	N	0.37	1.00						
IDO	N	N	N	N	N	N	N	N	0.34	1.00					
MHC-II	N	N	0.32	0.31	N	0.33	N	0.39	0.35	N	1.00				
TGF-β	N	N	0.36	N	N	N	N	N	N	0.57	N	1.00			
CCR6	0.65	0.36	N	N	N	N	N	0.31	N	N	N	N	1.00		
CCR7	0.37	N	N	0.29	N	N	N	0.31	0.38	0.33	0.40	N	0.29	1.00	
	Grupo	Idade	Tamanho	CD4	CD8	CD11c	CD83	FOX-P3	IL-10	IDO	MHC-II	TGF-β	CCR6	CCR7	

Legenda: A tabela apresenta os resultados com significância estatística (negrito) para a análise de correlação de Pearson. Índices positivos apresentam correlações diretamente proporcionais, índices negativos apresentam correlações inversamente proporcionais. Correlações abaixo de 0,28 foram consideradas fracas. CD4 (linfócitos T helper), CD8 (linfócitos T citotóxico), CD11c (células dendríticas mieloides imaturas), CD83 (células dendríticas mieloides maduras), FOXP3 (fator de transcrição para linfócitos T regulatórios), IL-10 (interleucina 10), IDO (enzima indolamina 2,3-dioxigenase), TGF- β (fator de transformação de crescimento beta), CCR6 (receptor de quimiocina MIP-3 α) e CCR7 (receptor de quimiocina MIP-3 β), N (relação sem significado estatístico).

Valor de p: o grupo e idade ($p < 0,01$), o grupo e tamanho tumoral ($p < 0,01$), o grupo e FOXP3 ($p < 0,02$), o grupo e CCR6 ($p < 0,01$). Entre a idade e CCR6 ($p < 0,01$) e entre a idade e o tamanho tumoral ($p < 0,01$). Entre o tamanho tumoral e TGF- β ($p < 0,01$), tamanho tumoral e MHC-II ($p < 0,03$), tamanho tumoral e CD4 ($p < 0,04$). Entre o CD4 e MHC-II ($p < 0,04$), o CD4 e CD11c ($p < 0,01$). Entre o CD8 e o CD11c ($p < 0,01$). Entre CD11c e MHC-II ($p < 0,02$). Entre FOXP3 e CCR7 ($p < 0,03$), FOXP3 e CCR6 ($p < 0,04$), entre FOXP3 e MHC-II ($p < 0,01$), entre FOXP3 e IL-10 ($p < 0,01$). Entre a enzima IDO e CCR7 ($p < 0,01$), entre IDO e IL-10 ($p < 0,02$). Entre MHC-II e CCR7 ($p < 0,01$). Entre CCR6 e CCR7 ($p < 0,05$). Entre CCR7 e o grupo ($p < 0,01$), CCR7 e IL-10 ($p < 0,01$).

Com base nos resultados obtidos na correlação de Pearson, foi realizado o teste multivariado de Pillai que verificou a influência global dos efeitos fixos de “grupos”, “idade dos animais” e “tamanho tumoral” sobre as contagens das marcações dos diferentes anticorpos utilizados. O teste demonstrou que todos os tumores tiveram influência nas variações imunológicas observadas no presente estudo. As variáveis “tamanho tumoral” e “idade” não influenciaram significativamente as contagens das variáveis imunológicas (tabela 5).

Tabela 5. Análise multivariada de Pillai, mostrando a influência das variáveis “grupo”, “idade” e “tamanho tumoral” sobre as imunomarcações realizadas.

	DF	Pillai	approx F	Pr(>F)
Grupo	4	2,25024	3,8581	1,128e-09 ***
Idade	1	0,31464	1,2521	0,2981
Tamanho	1	0,34544	1,4393	0,2069
Residuals	38			

Legenda: P<0.0001 ‘***’; DF: grau de liberdade;

Foi realizada então, uma análise univariada, com o objetivo de demonstrar o grau de influência de cada imunomarcação realizada sobre o grupo, a idade e o tamanho tumoral. Mesmo os fatores “idade” e “tamanho” apresentando relevância na análise univariada, seu resultado não foi considerado significativo, visto que de acordo com a análise multivariada de Pillai, estes dois fatores foram considerados “eventos ao acaso”, sendo portanto, desconsiderados dos resultados da análise univariada. No geral, a variável “grupo” teve influência para as variáveis CD4, CD8, CD11c, FOXP3, IL-10, MHC-II, CCR6 e CCR7.

Uma análise de perfil de grupos foi realizada à partir das variáveis que foram influenciadas pelo fator grupo (tabela 4, coluna “grupo”) e que estão identificadas no eixo “x” da figura 7. Foi possível observar que G1 (controles) e G2 (adenomas) se mantiveram abaixo da média e se distanciaram dos outros três grupos (G3, G4 e G5), formados por tumores malignos. O G3 (papilares) teve correlação com o tamanho tumoral e correlações discretas e até abaixo da média quando comparados com os outros grupos para as demais variáveis. O G4 (tubulares) apresentou alta correlação com a o FOXP-3, IL-10, CCR6 e CCR7. O G5 (sólidos) foi o grupo que teve maior correlação com o tamanho tumoral e com a idade elevada das fêmeas (idosas), bem como, com o nível de marcações para CCR6 (figura 9).

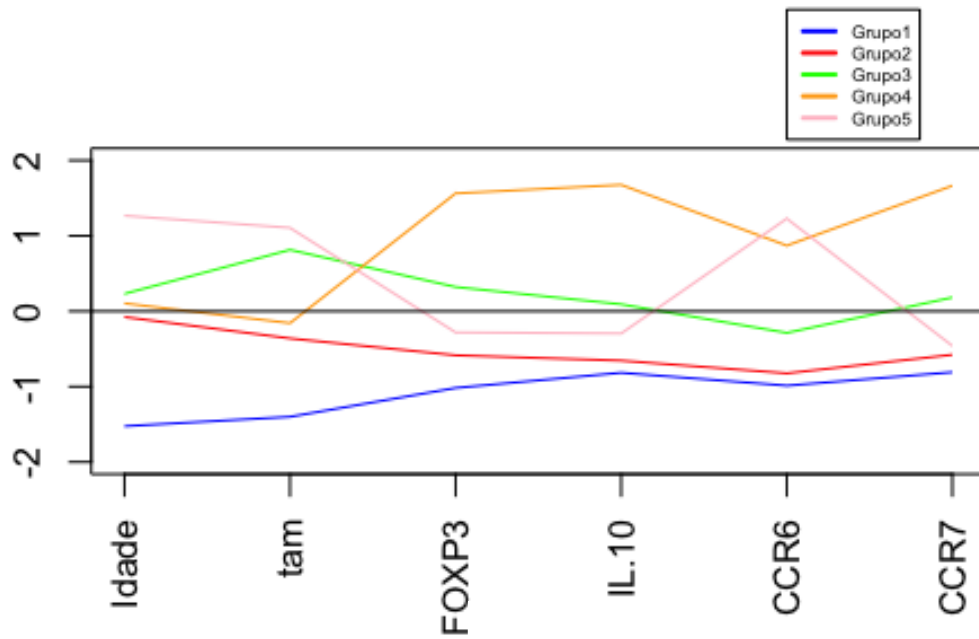


Figura 9. Médias padronizadas por grupo, das variáveis idade, tamanho tumoral, imunomarcações de FOXP-3, IL-10, CCR6 e CCR7 nas mamas com e sem tumor.

Legenda: tam: tamanho; FOXP3: fator de transcrição para linfócitos T regulatórios; IL-10: interleucina 10; CCR6 (receptor de quimiocina MIP-3 α); CCR7 (receptor de quimiocina MIP-3 β). Grupo1: amostras controles; grupo 2: adenomas; grupo 3: carcinomas papilares; grupo 4: carcinomas tubulares; grupo 5: carcinomas sólidos.

Por fim, uma análise discriminante foi construída para separar os tumores por características de malignidade e, de acordo com a correlação estabelecida entre as funções discriminantes com as variáveis originais (tabela 6), pode-se observar que somente as variáveis idade, CCR6 e CCR7 influenciaram na separação das amostras que tinham ou não tumores (agrupamento 1), enquanto que somente a variável CCR7 discriminou as amostras pela malignidade das mesmas (agrupamento 2). Para esta avaliação, foram consideradas associações importantes acima ou abaixo de 0,6 (figura 10).

Tabela 6. Correlação estabelecida para as funções discriminantes das variáveis originais do tecido mamário canino.

	FLD1	FLD2
Idade	-0,73	-0,53
Tamanho	-0,52	-0,42
Foxp3	-0,54	0,41
Il-10	-0,45	0,41
CCR6	-0,68	-0,12
CCR7	-0,62	0,63

Legenda: FLD1: função linear discriminante 1; FLD2: função linear discriminante 2; FOXP3: fator de transcrição para linfócitos T regulatórios; IL-10: interleucina 10; CCR6 (receptor de quimiocina MIP-3 α); CCR7 (receptor de quimiocina MIP-3 β).

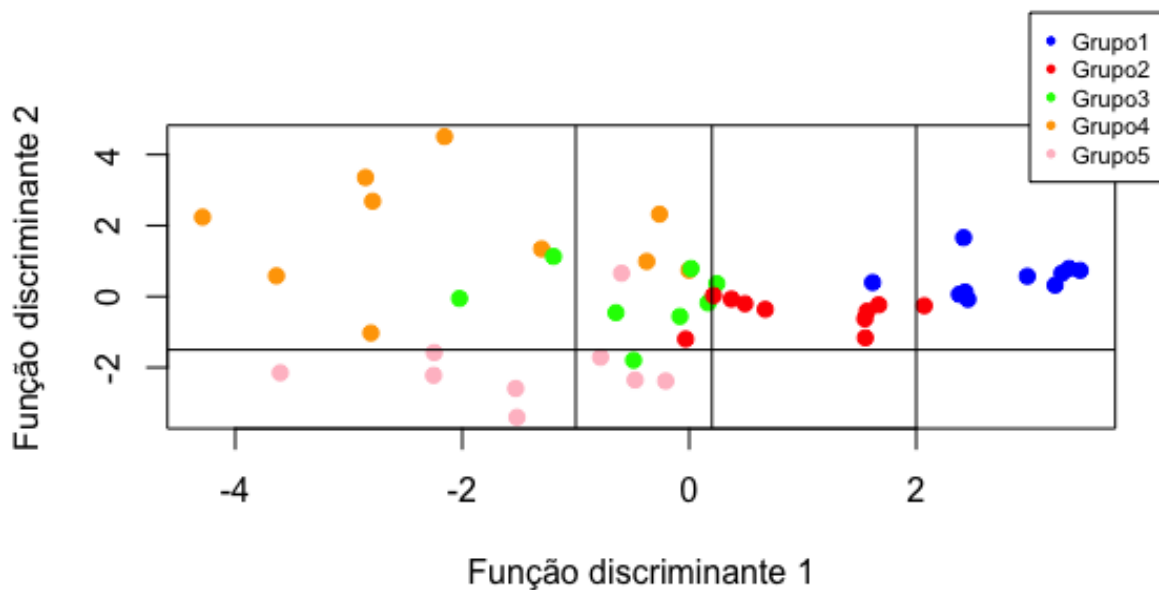


Figura 10. Representação gráfica discriminante por grupo (função discriminante 1) e por malignidade tumoral (função discriminante 2).

Legenda: função discriminante 1: representada pelas variáveis idade, CCR6 e CCR7; função discriminante 2: representada pela variável CCR7. Grupo1: amostras controles; grupo 2: adenomas; grupo 3: carcinomas papilares; grupo 4: carcinomas tubulares; grupo 5: carcinomas sólido.

Com base na figura 10, observou-se que a primeira função discriminante foi importante para separar o grupo controle e dos adenomas (G1 e G2, respectivamente) dos grupos de tumores malignos (G3, G4 e G5). A partir da segunda função discriminante, constatou-se a diferenciação de acordo com a malignidade tumoral, estabelecendo diferenças entre os animais dos G3, G4 e G5.

6. DISCUSSÃO

Na avaliação conjunta multivarada, as populações de DCs mieloides imaturas e maduras estiveram pouco expressas nos tumores estudados, bem como a população de linfócitos Treg. Todavia, na avaliação univariada, as DCs imaturas estiveram bem evidentes no G2 (adenomas) e em G3 (papilares), enquanto que os linfócitos Treg estiveram mais evidentes no G3 (papilares) e G4 (tubulares). Este fato chama a atenção pois pode refletir uma quebra de equilíbrio existente entre essas duas populações, seguindo os achados de Darrasse-Jèze e colaboradores (2009). Segundo a teoria do *feedback* de equilíbrio entre DCs e Tregs (como foi verificado em camundongos com diabetes tipo 1), a perda de DCs leva a uma perda consequente de linfócitos Treg, o que pode aumentar o risco do desenvolvimento de uma doença auto-imune. Essa diminuição de linfócitos Treg resulta em um aumento dependente de Flt3 em DCs, o que leva a um aumento homeostático das células Treg, que por sua vez leva a um retorno ao equilíbrio imune (DARRASSE-JÈZE et al., 2009). No presente estudo, por se tratar de neoplasias, foi possível perceber que esta homeostase foi afetada justamente quando há muito mais linfócitos Treg e poucas DCs nos tumores com histotipos mais agressivos, o que sugere uma atividade pro-tumoral.

Neste estudo, assim como em estudos anteriores (ROSOLEM et al., 2015) as DCs imaturas foram encontradas no parênquima tumoral e raramente no estroma e o inverso ocorreu com as DCs maduras. Nossos estudos ainda se assemelham aos encontrados por Bell et al. (1999), que relataram que em adenocarcinomas de mama em mulheres foi detectado que DCs imaturas ficam compartimentalizadas no meio das células tumorais, enquanto que DCs maduras ficam restritas à região peri-tumoral. De acordo com Bell et al (1999), esta separação de populações de DCs mieloides poderia indicar que os fatores estromais podem determinar a adesão das DCs, visto que fisiologicamente, as DCs maduras somente predominam em órgãos linfoides, onde elas interagem intimamente com os linfócitos T.

Em relação às correlações positivas encontradas, observou-se que quando aumentava as DCs imaturas (CD11c), também aumentavam os linfócitos T CD4 e

CD8. Todavia, a quantidade de células destas três populações foram baixas em relação às demais populações celulares avaliadas. Este fato pode indicar que um certo controle do tumor sobre as mesmas, já que a diminuição ou mesmo a ausência de linfócitos T citotóxicos (CD8) efetores já foi relacionado a um maior potencial metastático em adenocarcinomas mamários em mulheres (DeNARDO, et al., 2011), o que já indica uma atividade pró-tumoral. Correlações positivas significativas também foram observadas entre o MHC-II, tamanho tumoral, CD4, CD11c, FOXP3, IL-10 e CCR7 serão discutidas ao longo deste texto.

A correlação positiva entre a idade e o tamanho tumoral refletiu que quanto mais velhas as cadelas, maior foi o tamanho tumoral, o que corrobora com a literatura, que destaca que as cadelas de meia idade a idosas são as mais acometidas por tumorações em glândula mamária (QUEIROGA; LOPES, 2002; ZATLOUKAL et al., 2005; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Ao considerar todos os grupos avaliados, o tamanho médio das neoformações foi pequeno, todavia este estudo analisou apenas tumores do tipo simples, que tendem a ser menores que os carcinomas em tumores mistos, por exemplo, além de que, os tumores sem metástase regional ou à distância geralmente apresentam tumores com tamanho entre três e cinco centímetros, em média (QUEIROGA; LOPES, 2002), fato este observado neste estudo quando detectou-se que os únicos tumores com metástase regional deste estudo foram os que mediram nove e 7 centímetros, respectivamente.

Mesmo que o tamanho médio dos tumores tenha sido pequeno, os que mediram acima de cinco centímetros apresentaram maior expressão de MHC-II, TGF- β e CD4. O aumento de MHC-II, pode ser explicado por alteração de transcrição do gene HLA ou a modificação no pós-tradução (JIN LEE, et al., 2016); já o aumento de TGF- β , que é uma potente citocina anti-inflamatória inibidora da proliferação celular, que atua como um supressor da resposta imune, pode se tornar um fator oncogênico importante dentro do microambiente tumoral (KUBICZKOVA et al, 2012). O TGF- β também está envolvido na inibição da proliferação dos linfócitos T efetores e na inibição dos macrófagos e das DCs (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015). No presente estudo, a não evidenciação de DCs maduras em tumores maiores pode estar relacionada ao aumento do TGF- β .

Quanto à imunodeteccção de células positivas para MHC-II e de IL-10, estas estiveram altas. No entanto, a literatura relata que a presença de IL-10 tende a ajudar na diminuição do MHC-II e o CD86 expressos (molécula co-estimulatória assim como o CD83, de DCs maduras) (TZE et al., 2011; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015). Segundo Tze e colaboradores (2011), ratos com deficiência de CD83 apresentaram diminuição na seleção positiva de células T CD4 no timo e na expressão da superfície celular de MHC-II e CD86 em DCs, linfócitos B e epitélio tímico, ainda que a expressão de proteínas CD83 anula o efeito supressor da IL-10 na exibição de superfície de MHC-II e CD86.

A imunodeteccção aumentada de MHC-II pode ocorrer por alteração de transcrição do gene HLA ou a modificação pós-tradução, fato este que está sempre atrelado à progressão tumoral (JIN LEE, et al., 2016). Como no presente estudo houve pouca expressão de DCs imaturas e maduras, então é possível que outras células do sistema imunológico possam ter expressado MHC-II, numa troca de receptores e ligantes específicos. Uma situação crônica como nos tumores, permite o surgimento de mecanismos compensatórios, que podem confundir qualquer déficit primário, principalmente porque o CD11c pode ser expresso sobre macrófagos, células NK, células epiteliais e muitos outros leucócitos (DARRASSE-JEZE et al., 2009).

A imunodeteccção do MHC-II deveria ser em membrana plasmática, já que as moléculas deve estar na membrana plasmática no momento da comunicação com os linfócitos T virgens, e não no citoplasma como foi identificado neste estudo (ABBAS, LITCHAMN, PILLAI, 2015). Esse fato já foi identificado em estudos anteriores (ROSOLEM et al., 2015) e pode ser observado como uma ineficiente expressão de moléculas do MHC-II e que pode explicar a incapacidade de apresentação antigênica para linfócitos T virgens, ou seja, as moléculas de MHC-II não conseguem se deslocar para a membrana citoplasmática das APC's, assim como também foi descrito por Abbas; Lichtman; Pillai (2015).

A IL-10 é um interleucina que consegue inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas de MHC-II em DCs dentro de um microambiente tumoral, para inibir a ativação de linfócitos T e cessar as reações imunes mediadas pelas APC's. Se TGF- β e IL-10 são expressas em maior quantidade dentro do microambiente tumoral, suprimindo a presença das DCs maduras, isso indica que há

uma população elevada de linfócitos Treg presentes neste microambiente, mantendo o ambiente imunossupressor (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015); este fato não foi observado no presente estudo, visto que a população de linfócitos T regs não foi tão expressiva. Já a intensa presença de IL-10 observada pode ter induzido a diminuição da expressão de CD83 pelas DCs maduras.

A enzima IDO foi correlacionada positivamente com a IL-10, TGF- β e o CCR7 dentro das amostras analisadas. Esta correlação demonstra que a presença da enzima IDO possa ser mais um auxílio pró-tumoral, pois o catabolismo do triptofano através da atividade da enzima IDO pode causar falta de resposta e tolerância sobre os linfócitos T, já que as DCs que se diferenciaram sob as condições de baixo triptofano adquirem uma forte capacidade tolerogênica. Funcionalmente, as DCs privadas de triptofano mostram uma capacidade reduzida para estimular células T (BRENK et al., 2009). A presença da enzima IDO já foi relacionada à um pior prognóstico em pacientes humanos com tumores colo-retais (BRANDACHER et al., 2006; FERDINANDE et al., 2012).

Os grupos tumorais (G2 a G5) apresentaram correlações positivas com o CCR7, CCR6, IL-10 e FOXP3. A imunoexpressão de CCR6, CCR7, IL-10 e FOXP3 está associada à um prognóstico mais reservado (SHURIN, et al., 2006; BOYLE et al., 2015). O CCR7 é considerado um marcador importante na predição da metástase dos linfonodos axilares em carcinomas de mama em mulheres, porque a sua expressão excessiva é correlacionada com tumores primários maiores, invasão linfática mais profunda e taxas de sobrevivência mais pobres dada a promoção da expressão e a secreção do fator VEGF-C linfangiogênico (CUNNINGHAM et al., 2010; TUTUNEA-FATAN et al., 2015). Ainda há o fato de que algumas DCs imaturas também podem aumentar os níveis de CCR7 nos tecidos periféricos, o que lhes permite migrar para os órgãos linfoides sem assumir um fenótipo totalmente maduro. Essas DCs migratórias favorecem a indução de linfócitos Tregs adaptativos em vez de linfócitos efetores, o que diminuiu ainda mais o número de linfócitos T CD4 e CD8 efetores no sítio tumoral e aumentou mais ainda o número de linfócitos Tregs. A deficiência de CCR7 prejudica então a migração linfática de DCs imaturas e compromete a indução de tolerância (MALDONADO; VON ADRIAN, 2010), o que seria mais um fator pró-tumoral e que dificulta a atividade eficiente do sistema imunológico em deter o mesmo.

No presente estudo, a evidência de metástase regional ocorreu em dois casos onde os tumores eram macroscopicamente grandes e eram do histotipo sólido, o que ilustra esse conexão com o aumento de CCR7, principalmente no G5 (tumores sólidos).

O CCR6, que é um receptor da quimiocina MIP3- α , a principal quimiocina de atração de DCs imaturas *in vivo* (BANCHEREAU, et al., 2000), teve expressiva marcação em tumores maiores que cinco cm e em animais mais velhos, indicando a sua relação com a cronicidade da evolução tumoral. Em mulheres, a marcação de CCR6 é considerada um dos fatores de pior prognóstico, pois já foram ligados ao estágio e grau tumoral, uma vez que medeiam macrófagos e DCs para o microambiente tumoral (BOYLE et al., 2015) e em pacientes humanos com câncer colo-retal como um indicativo de mau prognóstico, principalmente por estar relacionado com metástase *in vivo* (LIU et al., 2014; BOYLE et al., 2015). Na análise de perfil de médias padronizadas nos grupos, foi possível observar que G4 e G5 tiveram maiores níveis de marcação para FOXP3, IL-10 e CCR7 e CCR6, tamanho tumoral e idade. Tais dados sugerem que o CCR6 teve papel importante na atividade de tumores mais agressivos em pacientes mais velhas. Estudos futuros devem ser realizados à fim de definir se o CCR6 também pode ser um fator prognóstico decisivo em cadelas, assim como é em mulheres (BOYLE et al, 2015).

A análise multivariada de Pillai demonstrou que as variáveis “grupo” e “tamanho tumoral” influenciaram diretamente o grupo de variáveis imunológicas avaliadas. Porém, quando foi avaliada quais variáveis exerceram influência nos grupos, as diferenças significativas foram somente para CD4, CD8, CD11c, FOXP3, IL-10, MHC-II, CCR6 e CCR7. Este resultado mostrou que a presença ou ausência de tumores na glândula mamária canina influenciou na menor ou maior proporção destes parâmetros na mama. Um estudo com câncer ovariano seroso em humanos levantou o termo “rede imunossupressora” agindo à favor da progressão da malignidade tumoral (PRESTON et al. 2013). Este termo foi utilizado para se referir à um grupo de marcadores tumorais que incluiu linfócitos TCD8, CD4 e T regs, que auxiliaram no desenvolvimento tumoral e na menor sobrevivência das pacientes. No presente estudo, a ação destas variáveis podem ter formado essa “rede imunossupressora”, ao auxiliarem na criação de um ambiente inibitório para o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente contra o tumor.

A correlação estabelecida entre as funções discriminantes com as variáveis originais resultou em uma relação estreita entre as variáveis idade, CCR6 e CCR7 (que influenciaram na separação das amostras) e na relação do CCR7 com a malignidade tumoral. De acordo com Suzuki et al., 2012, a expressão de CCR7 pelos linfócitos T regs pode ser correlacionada, fisiologicamente, com a idade em humanos, justamente pelo próprio envelhecimento do paciente, assim produzem menos linfócitos T regs e linfócitos T CD8, visto que a imunossenescência está associada a um estado inflamatório crônico. Em se tratando de um ambiente tumoral, sugere-se que o CCR6 poderia estar sendo expresso, aproveitando essa falha imunológica para atrair mais DCs tolerogênicas para o ambiente tumoral. A prova disso é a imunodeteção de CCR6 em paciente humanos com câncer colo-retal é um indicativo de mau prognóstico, principalmente por estar relacionado com metástase *in vivo* (LIU et al., 2014).

Já a evidente conexão entre a marcação de CCR7 e a malignidade dos tumores pode ser explicada pela capacidade do CCR7 auxiliar a disseminação do tumor. De acordo com Tutunea-Fatan e colaboradores (2015), o CCR7 emergiu como um marcador importante na predição da metástase dos linfonodos axilares em carcinomas de mama em mulheres, justamente porque a sua expressão excessiva é correlacionada com tumores primários maiores, invasão linfática mais profunda e taxas de sobrevivência mais pobres dada a promoção da expressão e a secreção do fator VEGF-C linfangiogênico. No presente estudo não houveram mais do que dois casos de metástase linfática regional e nenhum caso de metástase à distância; todavia, é impreciso afirmar que os tumores avaliados não evoluíram para a metástase, principalmente quando a figura 7 mostrou que no quadrante central há presença de animais que tiveram tumores papilar, tubular, sólido e até mesmo, adenomas. Essa miscigenação de tumores que receberam classificação histológica e graduação de malignidade diferentes (de acordo com as classificações para tumor de mama em cadelas propostas por de MISDORP, 1999, GOLDSCHIMIDT et al., 2011 e CASSALI et al., 2014 e a classificação quanto ao grau de malignidade como é definido por ELSTON e ELIS, 1998) provam que os tumores podem exibir um padrão estrutural e de desenvolvimento, e prova-se o quanto a atividade imunorregulatória está acima

dos padrões subjetivos e que influenciam muito mais, por exemplo, no tratamento futuro das pacientes.

Por fim, este estudo possibilitou observar que o microambiente tumoral consegue exercer uma força intensa e, em muitos casos, superior à força do sistema imunológico. Apesar de a resposta imune ser muito individual, ou seja, varia de paciente para paciente, de espécie para espécie, as formas de modulação e escape tumoral são bem pertinentes para qualquer paciente portador de um tumor. A percepção de que não somente uma célula, nem tão pouco um tipo celular, mas muitas células, de diversas funções, falham em suas funções originais, faz-se entender que exista uma verdadeira rede imunossupressora, formada para manter o desenvolvimento tumoral. Não foi diferente com a células dendríticas, os linfócitos T regulatórios, as interleucinas, as quimiocinas dentro dos tumores mamários caninos. Além disso, o fato de a idade avançada ser a fase mais comum para o desenvolvimento desta doença enaltece mais ainda a questão do envelhecimento do sistema imune, que decai a sua atividade em uma fase muito crítica, diante do crescimento neoplásico. Não resta dúvidas de que os tratamentos futuros contra o câncer deverão ser focados na modulação individual de cada sistema imunológico afetado pela presença de um câncer.

7. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

- As cadelas idosas foram as que apresentaram os maiores tumores (acima de cinco cm), principalmente do tipo sólido;
- Os quatro diferentes tipos tumorais estudados apresentaram variação quanto ao posicionamento das células dendríticas e linfócitos Tregs, principalmente; em sua maioria, as DCs imaturas permaneceram no parênquima tumoral, enquanto que as DCs maduras ficaram no peri-tumoral e nos infiltrados inflamatórios; já os linfócitos T regs permaneceram nos infiltrados inflamatórios no parênquima tumoral;
- Há uma estreita relação entre as populações de DCs mieloides imaturas/maduras e de linfócitos Tregs. Mesmo que as DCs estiveram pouco presentes dentro das amostras de tumores avaliados, a queda das duas populações pode indicar alguma quebra de equilíbrio;
- As citocinas TGF- β e IL-10, bem como a presença da enzimaIDO apresentaram marcante presença nas amostras malignas;
- A imunodeteção de CCR6 e CCR7 foi principalmente nos tumores mais agressivos; sendo que CCR6 teve alta relação com as pacientes mais idosas e com tumores maiores, bem representado no grupo dos carcinomas sólidos, que é o tipo histológico mais agressivo dentre os trabalhados neste estudo, o que pode refletir o envelhecimento do sistema imunológico;
- Os tumores benignos e os menos malignos (adenomas e papilares) apresentaram maior infiltração de linfócito T CD8, enquanto os mais malignos (tubulares e sólidos) apresentaram maior evidência da presença de linfócitos T CD4, TGF- β , IL-10 e MHC-II.

Agradecimentos: Os autores gostariam de agradecer ao Serviço de Oncologia Veterinária e ao Serviço de Obstetrícia Veterinária da Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Financiamento: Este estudo teve suporte financeiro provido Fapesp (processo nº 2012/09385-0) e bolsa de doutorado da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Conflito de interesse: os autores declaram que não houveram conflitos de interesse.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. A.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. Tolerância imunológica e autoimunidade. In: _____. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2015. Cap 15, p. 315-338.
- ARDAVÍN, C.; DEL HOYO, G. M.; MARTÍN, P.; ANJUÈRE, F.; ARIAS, C. F.; MARÍN, A. R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNÁNDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 691-700, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02059-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02059-2)>
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, Londres, v. 392, p. 245-252, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/32588>>.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto v. 18, p. 767–811, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>>
- BRAZ-SILVA, P.H. **Recrutamento de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (Treg) em lesões associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3 α** . 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BRANDACHER, G.; PERATHONER, A.; LADURNER, R.; SCHNEEBERGER, S.; OBRIST, P.; WINKLER, C.; WERNER, E. R.; WERNER-FELMAYER, G.; WEISS, H. E.; GOBEL, G.; MARGREITER, R.; NIGSRAINER, A. K.; FUCHS, D.; AMBERGER, A. (2006). Prognostic Value of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Colorectal Cancer: Effect on Tumor-Infiltrating T Cells. **Clinical Cancer Research**, v.12:1144-1151.
- BELL, D.; CHOMARAT, P.; BROYLES, D.; NETTO, G.; HARB, G. M.; LEBECQUE, S.; VALLADEAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA, K. A.; BANCHEREAU, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 190, n. 10, p. 1417–1425.
- BOYLE, S.T.; FAULKNER, J. W.; MCCOLL, S. R.; KOCHETKOVA, M. (2015). The chemokine receptor CCR6 facilitates the onset of mammary neoplasia in the MMTV-PyMT mouse model via recruitment of tumor-promoting macrophages. **Molecular Cancer**, 14:115.
- CAMPBELL, D. J. (2015). Control of regulatory T cell migration, function and homeostasis. **Journal of Immunology**, n.195, v. 6, p.2507–2513.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A.B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; OLIVEIRA, L.O.; SUEIRO, F.A.R.; BESERRA, H.E.O.; BERTAGNOLLI, A.C.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; CAMPOS, C.B.; ARAUJO, M.R.; CAMPOS, L.C.; MONTEIRO, L.N.; NUNES, F.C.; HORTA, R.S.; REIS, D.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; MAGALHÃES, G.M.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; TANAKA, N.M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E.M.; SALVADOR, R.C.L.; JARK, P.C.; DELECRODI, J.E.R.; NASCIMENTO, N.A.; SILVA, D.N.; SILVA, L.P.; FERREIRA, K.C.R.S.; FREHSE, M.S.; DI SANTIS, G.W.; SILVA, E.O.; GUIM, T.N.; KERR, B.; CINTRA, P.P.; SILVA, F.B.F.; LEITE, J.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, M.L.G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B.S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, 7, 38-69. 2014.

CARVALHO, T. B. **Neoplasia mamária em cadelas: caracterização histopatológica e expressão de proteínas de estresse (HSP 72)**. 2006. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

CHOW, M. T; MÖLLERB, A.; SMYTH, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 23– 32, 2012.

CUNHA, A.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F.C. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, Pleasanton, v.5, n.3, p. 495-502, 2004.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.495>

CUNNINGHAM, H.D.; SHANNON, L.A.; CALLOWAY, S.A.; FASSOLD, B.C.; DUNWIDDIE, I.; VIELHAUER, G.; ZHANG M.; VINES, C.M. Expression of the C-C Chemokine Receptor 7 Mediates Metastasis of Breast Cancer to the Lymph Nodes in Mice¹. **Translational Oncology**, v.3, n.6, p.354–361, 2010.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I – fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; ALESSI, A. C.; SANTANA, A. E.; MARTINS, M. I. M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781998000100016>>.

DARRASSE-JÈZE, G.; DEROUBAIX, S.; MOUQUET, H.; VICTORA, G. D.; EISENREICH, T.; YAO, H-H.; MASILAMANI, R. F.; DUSTIN, M. L.; RUDENSKY, A.; LIU, K.; NUSSENZWEI, M. C. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 206, n. 9, p. 1853-1862, 2009.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DE NARDI, A. B.; FERREIRA RAPOSO, T. M. M.; ASSUNÇÃO, K. A. Neoplasias Mamárias. In: _____. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 499-516.

DENARDO, D.G.; BRENNAN, D.J.; REXHEPAJ, E.; RUFFELL, B.; SHIAO, S.L.; MADDEN, S.F.; GALLAGHER, W.M.; WADHWANI, N.; KEIL, S.D.; JUNAID, S.A.; RUGO, H.S.; HWANG, E.S.; JIRSTRÖM, K.; WEST, B.L.; COUSSENS, L.M. Leukocyte Complexity Predicts Breast Cancer Survival and Functionally Regulates Response to Chemotherapy. **Cancer Discover**, v.1, p.54–67. 2011
doi:10.1158/2159-8274.CD-10-0028.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. (1998). Assessment of histological grade. ELSTON CW, ELLIS IO. Eds. Systemic pathology. The breast. London:Churchill & Livingstone, 365-384.

FELICIANO, M. A. R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 5, p. 1094-1100, 2012.

FERNANDES, C. **Aumento da frequência de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high} e CD8⁺CD25⁺FOXP3^{high} em pacientes menores de 15 anos com hanseníase multibacilar**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

GOGOLÁK, P.; RÉTHI, B.; HAJAS, G.; RAJNAVÖLGYI, E. Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. **Journal of Molecular Recognition**, Londres, v. 16, p. 299–317, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jmr.650>>.

FERDINANDE, L.; DECAESTECKER, C.; VERSET, L.; MATHIEU, A.; MOLES LOPEZ, X.; NEGULESCU, A. M.; VAN MAERKEN, T.; SALMON, I.; CUVELIER C. A.; DEMETTER, P. (2012). Clinicopathological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 expression in colorectal cancer. **British Journal of Cancer** 106, 141 – 147.

GABRILOVICH, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nature Reviews**, Londres, v. 4, p. 941-952.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p.117-131, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985810393258>>

GRIVENNIKOV, S. G.; GRETEN, F. R.; KARIN M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140 n. 6, p. 883–899. 2010.

HART, D. N. J. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**, Washington, v. 90, n. 9, p. 3245-3287, 1997.

JIN LEE, H.; SONG, I. H.; PARK, I. A.; HEO, S. H.; KIM, H. A.; AHN, J.H.; GONG, G. Differential expression of major histocompatibility complex class I in subtypes of breast cancer is associated with estrogen receptor and interferon signaling. **Oncotarget**, v.7, n.21, 2016.

JOLLES, S. Paul Langerhans - a historical perspective. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v. 55, n. 4, p. 243, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. In:_____. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 254-283.

KAH-WAI, L.; JACEK, T.; JACEK, R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 35-40, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.25847>>.

KRATHWOHL, M. D.; SCHACKER, T. W.; ANDERSON, J. L. Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 193, n. 4, p. 494-504, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/499597>>.

KUBICZKOVA, L.; SEDLARIKOVA, L.; HAJEK, R.; SEVCIKOVA, S. (2012) TGF- β – an excellent servant but a bad master. **Journal of Translational Medicine**, 3;10:183.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE R. **Small animal clinical oncology**. Missouri: Saunders, 2007. v. 4, cap. 26, p. 619-636.

LIU, J.; KE, F.; XU, Z.; LIU, Z.; ZHANG, L.; ET AL (2014). CCR6 Is a Prognostic Marker for Overall Survival in Patients with Colorectal Cancer, and Its Overexpression Enhances Metastasis *In Vivo*. **Plos one**, v9, n6, e101137.

LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 445-449, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02281-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02281-0)>.

MALDONADO-LÓPEZ, R.; MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p. 275–282, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/smim.2001.0323>>.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. **Advances in Immunology**, New York, v.108, p.111–165, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5> >.

MATIAS, B. F. **Avaliação da resposta imune mediada por macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos em pacientes oncológicos submetidos à imunoterapia com células dendríticas**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica) – Universidade Estadual do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

MIELCAREK, M.; KUCERA, K. A.; NASH R.; TOROK-STORB, B.; MCKENNA, H. J.; Identification and Characterization of Canine Dendritic Cells Generated *In Vivo*. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.13, n.11, p.1286–129, 2007.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In:_____. MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, 2002. p. 575-606.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T. P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: **WHO international histological classification of tumors of domestic animals**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1999. v. 8, p. 3-59. (Second Series).

MORRISON, W. B.; DeNICOLA, D. B. Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, Orlando, v. 8, p. 222-227, 1993.

MOULTON, J. E. Tumors of the mamary gland. In_____. **Tumors in domestic animals**. California: University of California Press, 1990. p.518-540.

NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C. Aspectos epidemiológicos das neoplasias mamárias caninas. In:_____. CASSALI, G. D. **Patologia Mamária Canina**. 1 ed. São Paulo: MedVet, 2017. p.27-31

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, n31, v. 2, p. 105-110, 2003.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B.M.F.P.P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. (2010). Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p.177-185.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. **Proceeding of the National Academy of Science**, Stanford, v. 96, p.1036–1041, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.3.1036>>.

PRESTON, C.C.; MAURER, M.J.; OBERG, A.L.; VISSCHER, D.W.; KALLI, K.R.; HARTMANN, L.C.; GOODE, E.L.; KNUTSON, K.L. (2013). The Ratios of CD8+ T Cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. **PLoS One**, v8, n11 p. 1-10.

QESKA, V.; BAUMGÄRTNER, W.; BEINEKE, A. Species-specific properties and translational aspects of canine dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 151, n. p. 181-192, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.003>>

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 97, n. 543, p. 119-127, 2002.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. <http://www.R-project.org>.

RAMOS, R. N.; MORAES, C. J.; ZELANTE, B.; BARBUTO, J. A. M. What Are the Molecules Involved in Regulatory T-Cells Induction by Dendritic Cells in Cancer? **Clinical and Developmental Immunology**, New York, v. 2013, n. 806025, p. 1-11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/806025>>.

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. 78f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, “Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

ROSOLEM, M.C.; VASCONCELOS, R. O.; GARRIDO E.; CASTANHEIRA T.L L.; MOREIRA P. R. R.; MAGALHÃES G. M.; ROZZA D. B.; RAMOS S.B. Immunodetection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in mammary carcinomas of female dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v35, n11, p. 906-912, 2015.

ROSOLEM, M.C.; FERNANDO, F.S.; MOREIRA, P.R.R.; VASCONCELOS, R.O. Relationship between inflammatory infiltrate canine mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Health Care**, v.1, n.1, p. no – 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14302/issn.2575-1212.jvhc-17-1586>>

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; COSTANTINO, C. M.; HAFLER, D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 490-500, 2010.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2785> >.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **PLOS ONE**, San Francisco, v10. n5. p. 1-15, 2015.

Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.012738> >.

SHALEV, I.; SCHMELZLE, M.; ROBSON, S. C.; LEVY, G. Making Sense of Regulatory T Cell Suppressive Function. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 282–292, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2011.04.003> >.

SOLIMAN, H.; RAWAL, B.; FULP, J.; LEE, J-H.; LOPEZ, A.; BUI, M. M.; KHALIL, F.; ANTONIA, S.; YFANTIS, H. G.; LEE, D. H.; DORSEY, T. H.; AMBS, S. Analysis of indoleamine 2-3 dioxygenase (IDO1) expression in breast cancer tissue by immunohistochemistry. **Cancer Immunol Immunotherapy**, Berlin, v.62, n.5, p. 829–837, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-013-1393-y> >

SHURIN, M.R.; SHURIN, G.V.; LOKSHIN, A.; YURKOVETSKY, Z.R.; GUTKIN, D.W.; ET AL. (2006). Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumorinfiltrating dendritic cells: friends or enemies? **Cancer Metastasis Reviews**, v.25:333–356.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **The Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 30, p. 1–22, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>>.

SUZUKI, M.; JAGGER, A.L.; KONYA, C.; SHIMOJIMA, Y.; PRYSHCHEP, S.; GORONZY, J.J.; WEYAND, C.M. (2012). CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺FOXP3⁺ T cells with immunosuppressive properties: a novel subset of inducible human regulatory T cells. **Journal of Immunology**, v189, n5, p2118-2130.

TEIXEIRA, L. A.; FONSECA, C. O. **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 172p, 2007.

THOMAS, R.; LIPSKYB, P. E. Dendritic cells: origin and differentiation. **Stem Cells**, Basel, v. 14, p. 96-206, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/stem.140196>>.

TORÍBIO, J. M. M. L.; LIMA, A. E.; MARTINS FILHO, E. F.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H.; TEIXEIRA, R. G.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D.; COSTA NETO, J. M. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 427-433, 2012.

TUTUNEA-FATAN, E.; MAJUMDER, M.; XIN, X.; LALA, P.K. (2015). The role of CCL21/CCR7 chemokine axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis. **Molecular Cancer**, 14:35

TZE, L.; HORIKAWA, K.; DOMASCHENZ, H.; HOWARD, D.R.; ROOTS, C.M.; RIGBY, R.J.; WAY, D.A.; OHMURA-HOSHINO, M.; ISHIDO, S.; ANDONIOU, C.E.; DEGLIESPOSTI, M.A.; GOODNOW, C.C. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10–driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 17, v. 208, p.149-65, 20144. doi: 10.1084/jem.20092203. Epub 2011 Jan 10.

WANG, Y. S.; CHI, K. H.; CHU, R. M. Cytokine profiles of canine monocyte derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide or tumor necrosis factor-alpha-induced maturation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 118, p. 186–198, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.05.010>>.

WIEDER, E. **Dendritic cells: a basic review**. Houston: International Society for Cellular Therapy, 2003. 6 p.

WING, J. B.; SAKAGUCHI, S. Multiple Treg suppressive modules and their adaptability. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, n. 178, p. 1-6, 2012.

ZATLOUKAL, J.; LORENZOVÁ, J.; TICHÝ, F.; NEČAS, A.; KECOVÁ, H.; KOHOUT, P. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. **Acta Veterinaria**, Brno, v. 74, p. 103-109, 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001.

WU, Y. S.; CHEN, S.N. Inflammation and Carcinogenesis. **Journal of Cancer Therapy**, v. 4, p.1449-1451, 2013.