

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE
CADELAS E SUA RELAÇÃO COM A
MALIGNIDADE DOS TUMORES MAMÁRIOS**

Thaís Larissa Lourenço Castanheira
Médica Veterinária

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE
CADELAS E SUA RELAÇÃO COM A
MALIGNIDADE DOS TUMORES MAMÁRIOS**

Thaís Larissa Lourenço Castanheira

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

2013

C346e Castanheira, Thaís Larissa Lourenço
Expressão de citocinas na glândula mamária de cadelas e sua
relação com a malignidade dos tumores mamários / Thaís Larissa
Lourenço Castanheira. -- Jaboticabal, 2013
x, 65 p. : il. ; 29 cm

Dissertação - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Co-orientadora: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Hélio Jose Montassier, Felipe Augusto Ruiz
Sueiro
Bibliografia

1. Neoplasias mamárias. 2. Cães. 3. Citocinas. 4. RT-PCR em
tempo real 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS E SUA
RELAÇÃO COM A MALIGNIDADE DOS TUMORES MAMÁRIOS

AUTORA: THAÍS LARISSA LOURENÇO CASTANHEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

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

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Prof. Dr. HELCIO JOSÉ MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Prof. Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO

Patologia e Biologia Molecular Veterinária / Campinas/SP

Data da realização: 24 de maio de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

THAÍS LARISSA LOURENÇO CASTANHEIRA – nascida em Jales, no dia 09 de novembro de 1984. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (FMVA-UNESP), Campus de Araçatuba, no ano de 2008. Entre março de 2007 e fevereiro de 2008 realizou trabalho de iniciação científica, com bolsa FAPESP, sob orientação da Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso Silva, com posterior publicação na revista *American Journal of Immunology*. Entre fevereiro de 2009 e janeiro de 2010 foi residente na área de Patologia Veterinária da FMVA-UNESP, sob orientação da Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado. Entre março de 2010 e fevereiro de 2011 foi residente na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus de Curitiba, sob orientação da Profa. Dra. Simone Domit Guérios. Durante o período de residência contribuiu com aulas para os alunos da FMVA-UNESP nas disciplinas de Patologia Geral e Especial; e, para os alunos da UFPR nas disciplinas de Oncologia Veterinária e Técnica Cirúrgica Veterinária. Desde março de 2011 é discente do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV-UNESP-Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Entre abril a novembro de 2011 prestou, semanalmente, atendimento clínico voluntário no Serviço de Oncologia Veterinária da FCAV-UNESP. Membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária (ABPV) desde 2009 e do corpo editorial do seu boletim desde a edição número 8 do mesmo ano. Sempre participativa dos eventos científicos da área, esteve inserida como autora ou colaboradora em: 38 resumos apresentados e publicados em anais de diversas reuniões científicas; dois artigos completos em revistas internacionais; três artigos completos em revistas nacionais e um em um boletim informativo.

EPÍGRAFE

Uma gata, o que é que tem?
- As unhas
E a galinha, o que é que tem?
- O bico
Dito assim, parece até ridículo
Um bichinho se assanhar
E o jumento, o que é que tem?
- As patas
E o cachorro, o que é que tem?
- Os dentes
Ponha tudo junto e de repente
Vamos ver no que é que dá

Junte um bico com dez unhas
Quatro patas, trinta dentes
E o valente dos valentes
Ainda vai te respeitar

Todos juntos somos fortes
Somos flecha e somos arco
Todos nós no mesmo barco
Não há nada pra temer

Ao meu lado há um amigo
Que é preciso proteger
Todos juntos somos fortes
Não há nada pra temer

Todos Juntos, Chico Buarque

DEDICATÓRIA

Dedicado a todos os cães com câncer de mama e aos seus proprietários por confiarem no incansável trabalho do médico veterinário.

Dedico, em especial, a todos os cães que participaram desta pesquisa: Atila, Lilica, Mel(s), Nina Mendonça, Pantera, Sol, Suzi... Sem os quais nada teria sido feito. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais,

Sebastião H. Castanheira e Neuci M. Lourenço Castanheira,

Pai, mãe, obrigada pela paciência e incentivo em todas as minhas jornadas (que foram muitas), por me motivarem desde pequena o gosto pela leitura e o amor aos animais. Obrigada por me ensinarem a fazer sempre o que é certo e perceber que por sermos imperfeitos também erramos. E do erro podemos cultivar a nossa humildade ao pedir perdão. Obrigada pelo amor incondicional a esta *capivarinha* que, de repente, cresceu!

À minha irmã,

Karol N. L. Castanheira,

Obrigada por tudo. Somos totalmente diferentes, mas isto nunca nos impediu de unirmos sempre o melhor de nós. Foram muitas conversas por telefone e muita distância, mas cada etapa que concluo em minha vida sei que sempre tive você ao meu lado.

Ao maior companheiro,

Eduardo Garrido,

Sem você nada do que conquistei até agora teria sentido. Talvez, por sermos tão diferentes é que nos amamos, pois sabemos amar a essência de cada um. Foi este amor sincero e livre que me permitiu voar para todos os lugares que sonhei antes de chegar até aqui e que me permitirá voar para tantos outros que eu ainda ei de sonhar. Admiro-te pela pessoa honesta e inteligentíssima que és.

À Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos,

Obrigada por toda dedicação e contribuição na minha vida profissional, desde a graduação na UNESP em Araçatuba e agora aqui, na pós-graduação na UNESP em Jaboticabal. Obrigada pela confiança depositada em mim durante estes dois anos de

pesquisa e pela oportunidade de continuarmos. É uma pessoa que tenho orgulho de conviver pela grande honestidade científica e pessoal, que vejo como raios de luz no mundo conturbado de hoje.

Ao Prof. Dr. Hélio Jose Montassier,

Agradeço professor, por toda sua contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu desenvolvimento intelectual. Por ter aberto as portas do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária e ter acreditado nesse projeto. Não conquistamos nada sozinhos e por isso, compartilho esta conquista com o senhor.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa,

Obrigada pela co-orientação e por ter permitido que fizesse parte do SOV, possibilitando o contato com os meus animais de estudo. A oncologia é uma paixão que compartilhamos.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros,

Que me ensinou o caminho para buscar as respostas deste trabalho.

Aos membros da banca do exame geral de qualificação,

Aos professores doutores Antônio Carlos Alessi e Hélio Jose Montassier. Obrigada pela disponibilidade de tempo e por contribuírem para que este trabalho se torne cada vez melhor.

Aos membros da banca de defesa,

Prof. Dr. Hélio José Montassier e Prof. Dr. Felipe Augusto Ruiz Sueiro. Obrigada por contribuírem com mais alguns alicerces para a construção deste trabalho.

Aos amigos de laboratório,

Eduardo Garrido e Mayara Carolina Rosolem, juntos vivemos muitas aventuras e desventuras, coletando exaustivamente material para nossos projetos.

Claudia Momo, sempre compartilhando experiências. Pessoa inteligentíssima e de opinião forte, que muito admiro e torço pelo sucesso!

Márcio Bandarra e Pamela Moreira, a dupla inseparável, sempre dando dicas “imunomarcadas”.

Andresa Matsui, a nossa IC com jeitinho de pós-graduanda, batalhadora e o que podemos chamar de “ponta firme”. Sucesso, garotinha!

Ao Filipe Santos Fernando, que me fez sentir parte do laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária. Ensinou-me PACIENTEMENTE a técnica de PCR em tempo real. Compartilhou de bom coração *papers* e qualquer outra informação que pudesse me ajudar. Você também faz parte desta conquista!

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária,

Francisca de Assis Ardisson, técnica do laboratório de histopatologia, obrigada pelas incontáveis lâminas insistentemente pedidas e repetidas. E pela paciência com a minha inexperiência quando aqui cheguei.

Teo e Edgar, pela ajuda nas necropsias. Tenho respeito e admiração por vocês.

Moema, nossa querida Momô, secretária da recepção, anteparo de muitos telefonemas e recados.

Ao Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP-Jaboticabal

Local que me acolheu e me fez crescer. Lugar onde encontrei pessoas gentis e geniais como a Ana Paula Jacinto e o Daniel Beretta, pessoas estas que por aqui também passaram e compartilharam coisas boas.

Ao Serviço de Obstetrícia Veterinária,

Sem o qual não teria coletado o meu material de estudo com a ajuda de todos os pós-graduandos e residentes que ali operaram/anestesiaram nas semanas de coletas. Obrigada, prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, por permitir esta relação junto ao setor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Que me contemplou com a bolsa durante o mestrado (Processo 2010/12946-8), e com o auxílio financeiro ao projeto (Processo 2012/09385-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Que me contemplou inicialmente com a bolsa de mestrado.

À Gráfica Atual,

Pela ajuda na finalização digital dos meus desenhos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Desenvolvimento da glândula mamária: aspectos embriológicos e imunológicos.....	2
2.2. Imunologia e Microambiente tumoral.....	8
2.3 Neoplasias da glândula mamária canina.....	15
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Triagem Clínica.....	19
4.2. Colheita das Amostras e Grupos Experimentais.....	20
4.3. Análise Histopatológica.....	20
4.4. Estadiamento clínico TNM.....	21
4.5. Análise Imuno-histoquímica.....	23
4.6. Colheita das amostras e Técnica de RT-PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	25
4.6.1. Extração de RNA total.....	25
4.6.2. Transcrição Reversa (RT).....	26
4.6.3. PCR em tempo real.....	29
4.7. Acompanhamento dos animais.....	30
4.8. Análise Estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Histopatologia e Imuno-histoquímica.....	32
5.2. Análise por contrastes ortogonais entre as citocinas e os grupos experimentais.....	32
5.2.1. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL $_{TS}$ entre o grupo dos adenomas (G2) e o grupo controle (G1).....	32
5.2.2. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL $_{TS}$ do grupo dos carcinomas (G6) em relação ao grupo controle (G1) e ao grupo dos adenomas (G2).....	33
5.2.3. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL $_{TS}$ entre os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas sólidos (G5).....	39
5.2.4. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL $_{TS}$ entre o grupo controle (G1) e os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas sólidos (G5).....	39
5.2.5. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL $_{TS}$ entre o grupo dos adenomas (G2) e os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas	40

sólidos (G5).....	
5.3. Sistema TNM.....	43
5.4. Análise do Coeficiente de Correlação de Spearman.....	45
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE.....	64
1A. Questionário de Avaliação do Paciente Oncológico.....	65



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010752/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Expressão de citocinas em tecido mamário e sua relação com a malignidade de tumores de mama em cadelas", sob a responsabilidade da Profª Drª Rosemeri de Oliveira Vasconcelos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

EXPRESSÃO DE CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS E SUA RELAÇÃO COM A MALIGNIDADE DOS TUMORES MAMÁRIOS

RESUMO - O microambiente do tecido mamário é regido desde o seu desenvolvimento embrionário por uma complexa rede de citocinas, como o TNF- α , o IFN- γ , a IL-4 e a IL-10, e de componentes celulares. O desequilíbrio entre a resposta destas citocinas e a presença de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T estão correlacionados com a malignidade dos tumores de mama em mulheres, auxiliando na progressão e metastatização dos carcinomas mamários. O objetivo deste estudo foi caracterizar a malignidade dos tumores de mama na espécie canina, por meio da expressão destas citocinas pela técnica quantitativa de RT-PCR em tempo real e da densidade de células inflamatórias pela técnica de imunohistoquímica. A expressão das citocinas e a densidade do infiltrado inflamatório foram comparadas em cada um dos grupos experimentais, através de análise de variância, utilizando-se como teste de comparação de médias, contrastes ortogonais, com nível de significância de 5%. O coeficiente de correlação de Spearman foi empregado para a análise de correlação entre as variáveis das citocinas, leucócitos e outros dados secundários. As maiores expressões de TNF- α , IL-4 e IL-10 e a presença de macrófagos e linfócitos T ocorreram nos carcinomas mamários, demonstrando que este conjunto de citocinas e células inflamatórias quando presentes no microambiente tumoral favorecem a progressão e malignização tumoral.

Palavras-chave: neoplasias mamárias, cães, citocinas, RT-PCR em tempo real.

CYTOKINE EXPRESSION IN MAMMARY GLAND OF BITCHES AND ITS RELATION TO MALIGNANCY OF MAMMARY TUMORS

ABSTRACT- The microenvironment of the breast tissue is governed since his embryonic development by a complex cytokine network including TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10, and cellular components. The imbalance between the response of these cytokines and inflammatory cells such as macrophages and lymphocytes had been correlated with the malignancy of breast tumors in women aiding in the progression and metastasis of breast carcinomas. The aim of this study was to characterize the malignancy of breast tumors in dogs through the expression of these cytokines by the technique of quantitative real time RT-PCR and the density of the inflammatory cells in canine mammary tissues by immunohistochemistry. The cytokine expression and density of inflammatory infiltrate were compared in each experimental groups, using analysis of variance, taking as tests of comparison of means, orthogonal contrasts, with a significance level of 5%. The Spearman rank correlation coefficient was used to analyze the correlation between the variables of cytokines, leukocyte, and others secondary data. The highest expression of TNF- α , IL-4 and IL-10 and the presence of macrophages and T lymphocytes occurred in breast carcinomas, demonstrating that this set of cytokines and inflammatory cells present in the tumor microenvironment can promote tumor progression, and malignancy.

Keywords: mammary neoplasias, dogs, cytokines, real time RT-PCR.

Listas de Abreviaturas

AC	Alteração de Crescimento
Ac	Anticorpos
cDNA	Sequência nucleotídica complementar de DNA
CFS	Fator estimulante de colônias
CT	“Threshold cycle”
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
E	Estrógeno
ER α	Receptor de estrógeno alfa
Er β	Receptor de estrógeno beta
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HE	Hematoxilina-Eosina
HCL	Ácido clorídrico
IL	Interleucina
MAC	Macrófagos
MaT	Microambiente tumoral
MEC	Matriz extracelular
NF κ B	Fator nuclear kappa B
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro

P	Progesterona
PCR	“Polimerase chain reaction” - Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real (quantitative PCR; real time PCR)
qRT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	“Reverse transcription” - Transcrição Reversa
STAT	“Signal transducers and activators of transcription” – Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TE	Tempo de evolução
TGF	Fator de transformação do crescimento
Th	Linfócitos T auxiliares (“helper”)
TIL _T	Linfócitos T infiltrantes no tumor
T _m	“Melting temperature” – Temperatura de dissociação
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNM	“Tumor-Node-Metastasis” – Tumor-Linfonodo-Metástase
Treg	Células T regulatórias
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano

Lista de Símbolos

α	Alfa
B	Beta
$\Delta\Delta$	Delta delta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
κ	Kappa
>	Maior
<	Menor
%	Porcentagem
ρ	Rô

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Mensuração do tumor primário (T).....	22
Tabela 2	Avaliação dos linfonodos (N) regionais.....	22
Tabela 3	Avaliação de metástases distantes (M).....	22
Tabela 4	Estágio clínico dos animais de acordo com a classificação TNM (OWEN, 1980).....	23
Tabela 5	Anticorpos utilizados para a imunomarcção dos linfócitos T e macrófagos, infiltrantes no tumor mamário canino.....	24
Tabela 6	Componentes dos mix I, mix II e mix III e volume adicionado por reação.....	28
Tabela 7	Código de acesso ao GeneBank com a sequência de pares de bases e sua temperatura de anelamento de acordo com o estudo de Peters, et al. (2005).....	29
Tabela 8	Médias e erro-padrão da média de TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos e linfócitos T em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinomas papilar (G3), tubular (G4) e sólido (G5).....	40
Tabela 9	Análise de médias e erro-padrão da média de TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos e linfócitos T em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinoma mamário (G6).....	41
Tabela 10	Parâmetros avaliados para a classificação TNM e a amostragem de animais vivos de acordo com cada grupo de carcinomas mamários.....	44
Tabela 11	Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para dados em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinoma mamário (G6).....	45

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 Fase embrionária do desenvolvimento da glândula mamária canina.....	4
Figura 2 Fotomicrografias de fragmentos de mama de cadelas do grupo controle, não acometidas por neoplasia mamária ou mastite. Hematoxilina e Eosina.....	34
Figura 3 Fotomicrografias de glândula mamária de cadelas apresentando adenoma. Hematoxilina e Eosina.....	35
Figura 4 Fotomicrografias de fragmentos de glândula mamária de cadelas apresentando três tipos histológicos de carcinoma simples. Hematoxilina e Eosina.....	36
Figura 5 Fotomicrografias de tecido mamário imunomarcadas com anticorpo anti-macrófagos.....	37
Figura 6 Fotomicrografias de tecido mamário imunomarcadas com anticorpo anti-CD3.....	38
Figura 7 Médias dos grupos controle (G1), adenoma (G2) e carcinomas papilar (G3), tubular (G4) e sólido (G5) para as variáveis TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos (MAC) e linfócitos T (LINF) e suas respectivas diferenças estatísticas.....	41
Figura 8 Médias dos grupos controle (G1), adenoma (G2) e carcinoma (G6) para as variáveis TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos (MAC) e linfócitos T (LINF) e suas respectivas diferenças estatísticas.....	42
Figura 9 Citocinas e células inflamatórias que compõe o microambiente da glândula mamária norma e tumoral.....	51

1. INTRODUÇÃO

A glândula mamária é um órgão em constante transformação, que desde o seu desenvolvimento embrionário é dependente de várias interações entre diversos fatores de transcrição gênica, citocinas e componentes celulares. Todo este conjunto que compõe o microambiente tecidual mamário, quando orquestrado fisiologicamente, permite o desenvolvimento, amadurecimento e involução adequados da glândula mamária nas fêmeas. Entretanto, este microambiente sob a regência de células neoplásicas, fatores de transcrição, citocinas, células inflamatórias infiltrantes e componentes celulares adjacentes, podem ser subvertidos podendo desenvolver mecanismos de evasão tumoral do sistema imune do hospedeiro, tornando possível a progressão e metastatização dos tumores.

Embora muitos estudos em humanos e com modelos experimentais de linhagens celulares vêm sendo realizados nesta área, pouco se sabe sobre os aspectos imunopatológicos dos tumores de mama em cadelas. Na medicina veterinária, poucas são as pesquisas existentes envolvendo o perfil das citocinas e das células inflamatórias nos tumores mamários caninos, e, quando presentes na literatura, abordam principalmente estudos a respeito das neoplasias mamárias derivadas de linhagens celulares caninas ou avaliações séricas. O conhecimento da imunopatologia tumoral é um amplo campo a ser estudado na medicina veterinária, uma vez que é a base para o desenvolvimento de perspectivas no campo da imunoterapia e marcadores biológicos, além de um amplo fator de impacto para o delineamento de medidas preventivas contra os tumores.

Portanto, o estudo da imunopatologia do microambiente tumoral *in vivo* traz a possibilidade de novas abordagens de pesquisa na medicina veterinária ao procurar explicar as complexas interações entre as citocinas e as células inflamatórias que ocorrem no tecido mamário neoplásico de cadelas, demonstrando a capacidade deste intrincado microambiente de prover mecanismos de desenvolvimento e progressão tumoral. Devido a isto, este estudo objetiva avaliar o perfil das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 e dos macrófagos e linfócitos T associados ao microambiente tumoral canino, relacionando-os à malignidade dos carcinomas mamários.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento da glândula mamária: aspectos embriológicos e imunológicos

Os pesquisadores Knight e Peaker (1982) descreveram a glândula mamária como sendo uma estrutura intrigante e fascinante durante o seu desenvolvimento, sendo o órgão que provavelmente mais sofre transformações durante a vida de um animal. Tais mudanças compreendem o tamanho, a estrutura, a composição e suas atividades. Estas transformações começam logo durante o desenvolvimento embrionário e continuam mesmo após a sua maturidade sexual, pois a glândula mamária aumenta e diminui em cada ciclo reprodutivo, sofrendo hipertrofia e involução a cada gestação.

A glândula mamária é, portanto, um órgão cujo crescimento é multifatorial e multidimensional envolvendo fatores intrínsecos ao animal, sejam eles locais ou sistêmicos, bem como extrínsecos, como o meio ambiente e a dieta (KNIGHT; PEAKER, 1982; BORENA et al., 2013).

Desenvolvimento embrionário da glândula mamária

O desenvolvimento fetal deste órgão envolve três fases: a) determinação do posicionamento da cadeia mamária na linha ectodérmica (estendendo-se no sentido craniocaudal) aonde irão se formar espessamentos e cristas bilaterais; b) posicionamento e número exato de glândulas, os quais são determinados pela localização e número dos botões mamários embrionários; c) formação do sistema de ductos que se faz a partir dos brotos primários os quais se desenvolvem a partir das papilas e, dos brotos secundários, que são ramificações dos primários (KNIGHT; PEAKER, 1982; SORENMO et al., 2011).

Watson e Khaled (2008) descreveram a sequência de aparecimento dos pares dos botões mamários em embriões de camundongos, os quais, apesar de simetricamente posicionados, respondem a diferentes sinais que são requeridos a

cada par em um determinado tempo. Um destes sinalizadores observados foi o fator de crescimento de fibroblastos-10 (FGF-10). A ordem de aparecimento destes botões mamários é: primeiro as mamas abdominais craniais, depois as abdominais caudais, seguido das mamas torácica cranial e inguinal, as quais aparecem simultaneamente e, por último, a mama torácica caudal.

Com o aparecimento dos pares de botões mamários, inicia-se o desenvolvimento dos tecidos mesenquimal e epitelial mamários (KNIGHT; PEAKER, 1982). A parte mesenquimal proporciona uma matriz extracelular (MEC) com diversos tipos celulares como os fibroblastos, células endoteliais e adipócitos, além de componentes como o colágeno, fibronectina, proteoglicanos e laminina (PEAKER, 2002; LI; XIE, 2005; WATSON; KHALED, 2008). O tapete adiposo que se forma na mama, permite que todos os ramos ductais proliferem e se diferenciem (KNIGHT; PEAKER, 1982; WATSON; KHALED, 2008; WATSON; OLIVER; KHALED, 2011). Em cães adultos a distribuição do tecido adiposo se torna desigual, sendo mais abundante nas glândulas abdominais e inguinais (SORENMO et al., 2011).

Quanto ao componente epitelial, a divisão se faz basicamente entre dois tipos celulares, o luminal e o basal. O epitélio luminal forma os ductos e alvéolos, enquanto o epitélio basal constitui as células mioepiteliais (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011; BORENA et al., 2013).

Os macrófagos (MACs) são recrutados e concentram-se na porção caudal do botão mamário, realizando a fagocitose das células epiteliais apoptóticas locais. Tal fato está correlacionado com o maior índice mitótico dos brotos e ramificações alveolares desta região (GOUON-EVANS et al., 2002; GYORKI et al., 2009). Além disso, a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos MACs é necessária para o crescimento e diferenciação do tecido mamário (GOUON-EVANS et al., 2002). Sendo o TNF- α também importante para a adipogênese do tecido mamário (SCHWERTFEGER; ROSEN; COHEN, 2006).

As fases do desenvolvimento embrionário da glândula mamária estão resumidamente esquematizadas na Figura 1.

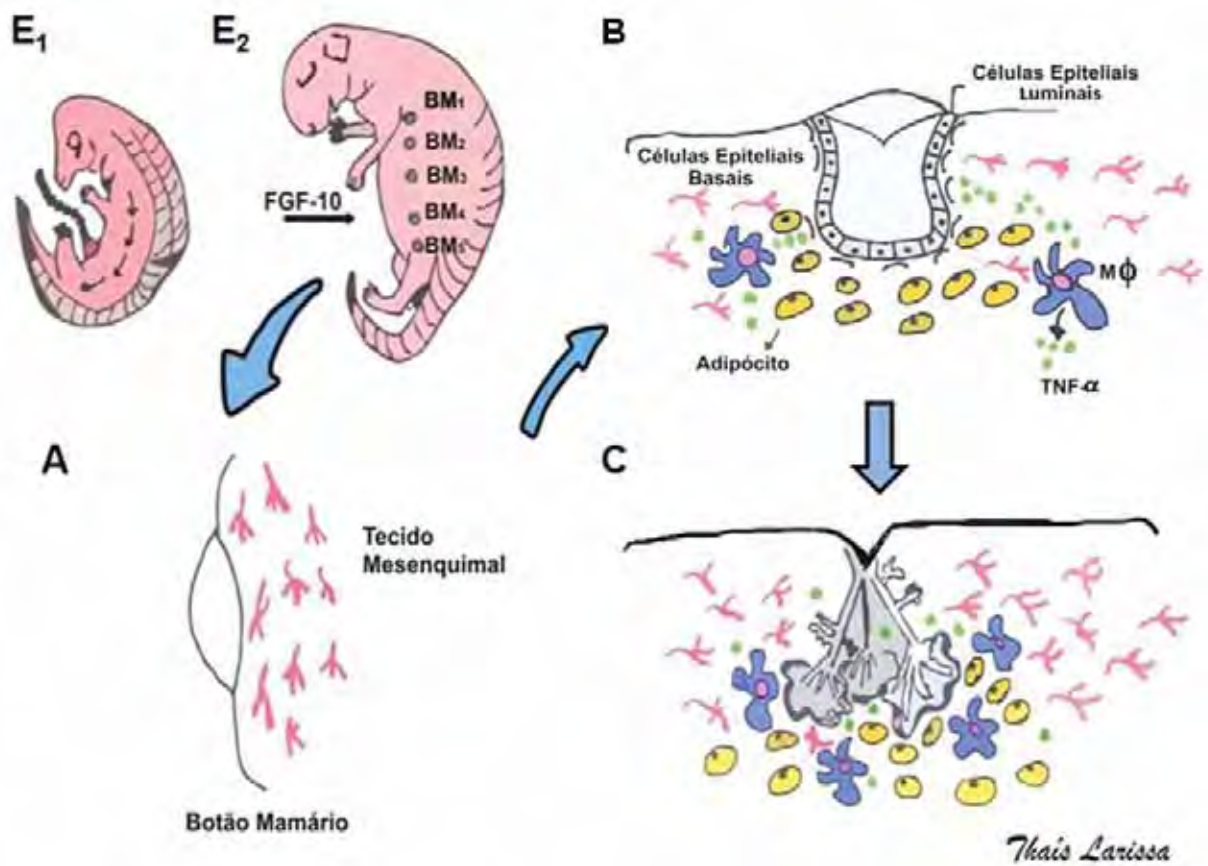


Figura 1. Fase embrionária do desenvolvimento da glândula mamária canina.

E1: Posicionamento da cadeia mamária na linha ectodérmica, no sentido craniocaudal. **E2:** O surgimento dos botões mamários (BM) e sua sequência de desenvolvimento na cadeia mamária são regidos pelo FGF-10. **A:** Surgimento do tecido mesenquimal. **B:** O tecido epitelial separa-se em células luminais, que formarão ductos e alvéolos, e células basais, localizadas adjacente às primeiras, compondo as células mioepiteliais. O tapete adiposo se forma para dar sustentação ao crescimento dos ramos primários ductais, permitindo que estes se diferenciem. Macrófagos ($M\phi$) são recrutados e localizam-se caudalmente ao botão mamário, sendo responsáveis pela fagocitose das células epiteliais luminais e pela secreção do $TNF-\alpha$. Esta citocina é responsável pelo crescimento e diferenciação do tecido mamário e pela adipogênese. **C:** A diferenciação e o crescimento dos primeiros ramos ductais e alvéolos rudimentares devem-se à harmônica interação das estruturas e sinalizadores que compõe o microambiente mamário.

Figura baseada nos estudos de Gouon-Evans et al. (2002), Watson e Khaled (2008), Gyorki, et al. (2009) e Watson, Oliver e Khaled (2011) em camundongos, e modificada a partir da ilustração “desenvolvimento embrionário da glândula mamária” de Watson e Khaled (2008).

Desenvolvimento pós-natal da glândula mamária

Na fase pós-natal a migração leucocitária é importante para o desenvolvimento do tecido mamário devido à secreção de diversos sinalizadores por estas células. Estudos em camundongos demonstraram o perfil leucocitário durante o desenvolvimento deste tecido. Por exemplo, o recrutamento de MACs e eosinófilos, na fase pós-natal, está relacionado com a formação e crescimento dos botões mamários primordiais (GOUON-EVANS et al., 2002).

Estes leucócitos se concentram em locais diferentes ao redor do botão mamário (GOUON-EVANS et al., 2002). Os MACs, presentes desde a fase embrionária na porção cranial dos ductos, continuam a realizar a fagocitose das células epiteliais apoptóticas durante o desenvolvimento dos ductos e mantém suas atividades parácrinas nas células adiposas, controlando a adipogênese (SCHWERTFEGER et al., 2006). Já os eosinófilos são encontrados na porção cranial e parecem, também, estar envolvidos no recrutamento dos MACs (GOUON-EVANS et al., 2002).

Outros leucócitos, como os linfócitos T e B e os neutrófilos, não são encontrados circundando as estruturas epiteliais durante a puberdade, embora eles estejam presentes em linfonodos localizados próximos à mama abdominal caudal (GOUON-EVANS et al., 2002).

É durante a puberdade, sob a ação do estrógeno (E) e da progesterona (P), que as glândulas mamárias irão se desenvolver e os ductos e alvéolos deixam de apresentar aspectos rudimentares (WATSON; KHALED, 2008). Nesta fase o E é muito mais importante do que a P para o desenvolvimento do epitélio e do estroma mamário, sendo, ainda, a expressão do receptor de estrógeno alfa ($ER\alpha$), pelas células epiteliais dos ductos e alvéolos, mais importante para este desenvolvimento que a expressão do receptor beta ($ER\beta$). Para que ocorra a expressão do $ER\alpha$ é necessário que as células epiteliais expressem um fator de transcrição conhecido como Gata-3 (KOUROS-MEHR et al., 2006; WATSON; KHALED, 2008; WATSON; OLIVER; KHALED, 2011). O Gata-3 é responsável por manter a diferenciação das células epiteliais em células epiteliais luminais (KOUROS-MEHR et al., 2006). Outro fator de transcrição expresso no tecido mamário é o transdutor de sinal e ativador de

transcrição 1 (STAT1), o qual é responsável por manter um perfil de citocinas semelhante ao expresso pelos linfócitos T auxiliares 1 (Th1), como o TNF- α , o interferon gama (IFN- γ) e a interleucina 12 (IL-12).

Dentre as citocinas, o TNF- α está relacionado, como elucidado na fase embriogênica, com a morfogênese do tecido mamário e o seu crescimento. Como os MACs são grandes secretores desta citocina, é importante que estes leucócitos sejam recrutados da medula óssea até o sítio de mamogênese. Assim sendo, o fator estimulante de colônias-1 (CFS-1), produzido pelas células epiteliais em desenvolvimento, é responsável pela proliferação e sobrevivência dos MACs locais, o que parece garantir a permanência do TNF- α neste ambiente, enquanto for necessário para a mamogênese (GOUON-EVANS et al., 2002; PIXLEY; STANLEY, 2004). Os MACs e o tecido adiposo interagem por meio de “feedback” positivo, onde diversas adipocinas modulam a secreção de TNF- α e IL-6 pelos MACs que, por sua vez, regulam a adipogênese necessária para a glândula mamária (SCHWERTFEGER; ROSEN; COHEN, 2006).

Todo este ambiente imunológico da vida pós-natal é mantido além da fase de puberdade, ou seja, estas características são mantidas enquanto as fêmeas dos camundongos adultos são nulíparas (KOUROS-MEHR et al., 2006; WATSON; KHALED, 2008).

A prenhez é o momento em que ocorre uma alteração abrupta do perfil imunológico das células epiteliais mamárias, que, de um perfil semelhante aos linfócitos Th1, mudam para um perfil Th2. Este fato foi correlacionado com a mudança de expressão de STAT1 para STAT6, que permanece até a lactação. A expressão de Gata-3 se mantém e, junto com o STAT6, são responsáveis pelo aumento da expressão do receptor alfa da interleucina 4 (IL-4R α). Nesta fase, observa-se um aumento das citocinas IL-4 e IL-13, as quais são responsáveis pela elevação do número de alvéolos mamários. Com o avanço da gestação, outras citocinas são expressas, como a IL-10, que auxilia os novos alvéolos mamários a diferenciar-se em alvéolos maduros (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011). Os receptores de progesterona (RP) tornam-se mais importantes que os RE, atuando também sobre o amadurecimento dos alvéolos mamários (WATSON; KHALED, 2008).

No início da fase de lactação, além dos leucócitos mencionados, há relatos de mastócitos em tecidos mamários de camundongos, porém, ocorre uma diminuição de todos os leucócitos, mas principalmente dos mastócitos com o avançar desta fase (SZEWCZYK et al., 2000; GOUON-EVANS et al., 2002).

Outro aspecto importante durante a prenhez e lactação é com relação ao papel dos proto-oncogenes. Estudos em camundongos transgênicos e linhagens celulares vêm demonstrando a importância de vários proto-oncôgenes que, sob influência dos fatores de crescimento como o FGF e a presença de E e P são capazes de atuarem fisiologicamente no remodelamento dos diferentes tecidos que compõem a glândula mamária nestas duas fases. Contudo, com uma única mutação e consequente transformação de um proto-oncogene em oncogene, uma célula epitelial mamária pode se tornar neoplásica e sob a influência dos mesmos fatores de crescimento e hormônios, se torna capaz de redirecionar todo o microambiente local a favor da tumorigênese (DICKSON; CREER; FANTL, 2000). Exemplos destes proto-oncogenes envolvidos são os genes relacionados às ciclinas, por exemplo, a ciclina D1 (CCND1) que está envolvida no controle do ciclo celular na fase G1 (DICKSON; CREER; FANTL, 2000; LEE; MULLER, 2010) e proto-oncogenes relacionados aos receptores de tirosina quinase (DICKSON; CREER; FANTL, 2000), como o c-erb-2, também conhecido como Her-2 ou Her-2/neu, comumente expresso como oncogene nos carcinomas de glândula mamária (HOUSTON et al., 1999).

Com o fim da lactação deve ocorrer a involução da glândula mamária, e este, é um dos exemplos mais dramáticos da regulação fisiológica da apoptose em um tecido adulto. A série de eventos entre a apoptose, a fagocitose das células apoptóticas e dos glóbulos de gordura do leite associados à nova adipogênese e o remodelamento da MEC, requer um controle preciso da resposta inflamatória (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011).

Os fatores de transcrição envolvidos na involução mamária são o STAT3 e o fator nuclear kappa B (NF κ B), enquanto o Gata-3 passa a ser suprimido. O STAT3 é responsável pelo balanço entre a resposta inflamatória e anti-inflamatória, em que o fator de transformação do crescimento beta 3 (TGF β 3) é a principal citocina anti-inflamatória expressa, enquanto o TNF- α é a principal citocina inflamatória. O NF κ B é

ativado pelo TNF- α e é responsável pela regulação da apoptose (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011).

Um fato importante é que este microambiente do tecido mamário, durante as fases de involução, com o cessar da lactação, apresentam semelhanças entre o remodelamento mamário e a tumorigênese (STINGL, 2009; O'BRIEN et al., 2010; KAIMALA et al., 2012).

2.2. Imunologia e microambiente tumoral

Existem dois principais conceitos em imunologia tumoral: os mecanismos de imunovigilância e os mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro. Este último evento permite às células neoplásicas criarem um ambiente de tolerância, levando ao crescimento e à malignidade tumoral (SATYAM et al., 2011; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

Embora a tumorigênese pareça ser um processo sempre irreparável para o organismo, um tumor precisa ultrapassar ao menos duas barreiras para o desenvolvimento do microambiente tumoral (MaT). A primeira das barreiras é a obtenção de nutrientes de forma que permitam o seu crescimento rápido e, a segunda, é adquirir mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro (VILLALBA et al., 2013).

Barreira 1: Nutrição Tumoral

Para a primeira barreira, os tumores tendem a obter energia, preferencialmente, através da fermentação (glicólise anaeróbica). Embora produza menos adenosina trifosfato (ATP), esta via é mais rápida que a fosforilação oxidativa, o que confere uma excelente vantagem às células tumorais em rápido desenvolvimento (WARBURG, 1930; WARBURG, 1956).

A angiogênese é um processo dual, servindo tanto para a obtenção de nutrientes quanto para progressão dos tumores. Uzzan et al. (2005) demonstrou a que a angiogênese nos carcinomas mamários de mulheres está relacionada a um pobre prognóstico. Este processo permite o rápido desenvolvimento tumoral e

estudos em tumores mamários de mulheres já correlacionaram a presença de macrófagos com a neovascularização do sítio tumoral, sendo estas células inflamatórias importantes para o remodelamento da MEC, pois secretam o fator de crescimento epitelial (EGF) (O'SULLIVAN et al., 1993) e, através da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), induzem a proliferação, diferenciação e migração das células endoteliais (FERRARA, 2004).

Os oncogenes, por sua vez, estimulam a expressão de VEGF pelas células epiteliais mutadas, amplificando a resposta angiogênica, independentemente dos TAM. Estes oncogenes também promovem uma hiperexpressão dos receptores de EGF (EGFR), tornando as células mutadas mais responsivas (CRUIJSEN; GIACCONE; HOEKMAN, 2005). O TNF- α também é um dos responsáveis pela regulação positiva de vários fatores de crescimento angiogênicos como, por exemplo, o VEGF (EISENTHAL et al., 2003; SASI et al., 2012).

Inicialmente associava-se a secreção desta citocina apenas aos macrófagos, mas cada vez mais vêm se demonstrando a secreção do TNF- α por diversas células neoplásicas (AGGARWAL et al., 2006; COUSSENS; POLLARD, 2009). Vona-Davis e Rose (2009), em uma ampla revisão a respeito da angiogênese e sua relação com o tecido adiposo na glândula mamária, caracterizaram o TNF- α como uma das adipocinas envolvidas na angiogênese, essencial tanto para o desenvolvimento tumoral quanto para a adipogênese.

Barreira 2: Imunovigilância contra os tumores

Para a superação da segunda barreira, é preciso saber como o hospedeiro reage imunologicamente frente a uma ameaça carcinogênica. Basicamente, a resistência aos tumores envolve mecanismos de destruição das células tumorais, tanto pela ação da imunidade intata por macrófagos e células naturais "Killer" (NK), quanto pela imunidade adquirida, por meio, por exemplo, da ação dos linfócitos T que desencadeiam uma resposta imune celular (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012).

Os linfócitos T podem diferenciar-se em linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL), os quais podem reconhecer e matar as células tumorais que expressam peptídeos que são apresentados pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) classe I. No entanto, a diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ em CTL efetivos podem também requerer um segundo sinal vindo das células T CD4⁺. Os CTL liberam grânulos como as perforinas e granzimas, com ação citotóxica, além do IFN- γ (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2012; HORIUCHI et al., 2007; CHIKAMATSU et al., 2008).

Os linfócitos T também podem diferenciar-se em células CD4⁺ (HORIUCHI et al., 2007), que são ativadas pelo reconhecimento de peptídeos expressos pelas moléculas MHC classe II. As células CD4⁺ são subdivididas em Th1 e Th2, cada qual com um perfil de citocinas específicas, responsáveis pelo equilíbrio imunológico do organismo. Do ponto de vista funcional, as células Th1 desenvolvem a resposta imune celular. A secreção das citocinas IFN- γ e TNF- α é característica deste perfil celular, enquanto que as células Th2 desenvolvem a resposta imune humoral e secretam, por exemplo, a IL-4 e IL-10 (REED 1995; YAMAZAKI et al., 2002; HORIUCHI, et al., 2007).

Os estudos de Horiuchi et al. (2007) caracterizaram o perfil de linfócitos Th1/Th2 no sangue periférico de cães adultos saudáveis e observaram uma predominância da população Th1. Por outro lado, o desequilíbrio para um perfil Th2 tem sido correlacionado com o desenvolvimento de diversos tumores como o carcinoma de bexiga (SATYAM et al., 2009), o adenocarcinoma pulmonar (YAMAZAKI et al., 2002) e o carcinoma de células escamosas (CHIKAMATSU et al., 2008). Estes estudos sugerem que as neoplasias malignas parecem suprimir a resposta antitumoral das células Th1 nos tecidos e na circulação (SATYAM et al., 2009).

As células NK são capazes de lisar as células alvo, por meio de receptores de superfície celular, havendo a liberação de grânulos citotóxicos, iguais aos dos CTL. Estes linfócitos secretam várias citocinas que apresentam importante papel na resposta imune, sendo importantes para uma resposta longa e duradoura contra as células tumorais (HORIUCHI et al., 2007; CHIKAMATSU et al., 2008). Outra ação das células NK, demonstrada *in vitro*, é por meio da sua associação com alguns anticorpos (Ac) do hospedeiro contra alguns antígenos tumorais. O receptor Fc das células NK (ou macrófagos) se ligam a estes Ac, ativando as células NK que irão secretar seus grânulos citotóxicos e citocinas como o IFN- γ . Este mecanismo de ação

é conhecido como citotoxicidade dependente de anticorpos e tem sido alvo de pesquisas para a imunoterapia (ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2012).

Mecanismos de Evasão Tumoral

Entendendo o processo de imunovigilância, Schreiber et al. (2011) formularam a teoria do desenvolvimento tumoral em três fases: na primeira fase, o sistema imune está intacto e a resposta imunológica contra os tumores é efetiva (sendo a fase de imunovigilância, propriamente dita); na segunda fase, há um equilíbrio imunológico entre a neoplasia e o sistema imune. Contudo, nesta fase, o sistema imune também exerce uma pressão seletiva sobre as células carcinogênicas, selecionando células com mutações favoráveis aos mecanismos de evasão tumoral (fase de imunoeedição); e, na terceira e última fase, há uma instabilidade genética e epigenética, com o tumor interferindo nas regulações gênicas do MaT, possibilitando amplas vias de escape, resultando, assim no desenvolvimento do tumor.

O TNF- α , que embora tenha sido inicialmente descoberto e nomeado por conta da sua atividade antitumoral, é cada vez mais relacionado com atividades pró-tumorais, associado a ações durante a inicialização e a progressão tumoral (BALKWILL, 2009). O TNF- α , dentro do MaT, está envolvido com todas as etapas da tumorigênese, ou seja, a transformação celular, a sobrevivência, a proliferação, a angiogênese, a invasão e a metástase (BALKWILL, 2009; SETHI et al., 2012).

Estudos *in vitro* demonstraram que esta citocina, ao ativar o NF κ B das células epiteliais neoplásicas, tornam-as com maior capacidade invasiva ao promover o remodelamento da MEC e a angiogênese, através da ativação de diversas vias; ao inibir a apoptose e ao tornar as células tumorais resistentes à quimioterapia, imunoterapia e radioterapia (AGGARWAL et al., 2006).

Esta ampla atuação do TNF- α sobre as células, ora ativando, ora suprimindo certas atividades pode ser explicada pela presença de dois receptores do TNF: o TNFR-1 e o TNFR-2. Ambos interagem com distintas proteínas para formar seus receptores, sendo elas, a proteína p55 e p75, respectivamente (PINCKARD; SHEEHAN; SCHREIBER, 1997). Estas proteínas compartilham alguns domínios

extracelulares homólogos, mas intracelularmente seus domínios não apresentam nenhuma homologia (SMITH; FARRAH; GOODWIN, 1994).

O TNFR-1 sinaliza tanto mecanismos pró-apoptóticos quanto mecanismos para a sobrevivência celular, em que, neste último caso, há uma estimulação do NF κ B, cessando a apoptose (SASI et al., 2012). Contudo, seus efeitos estão relacionados principalmente à morte celular e aos efeitos de citotoxicidade do TNF- α (WONG; GOEDDEL, 1994).

O TNFR-2 está relacionado com a angiogênese no MaT, através da regulação positiva com o VEGF (GOUKASSIAN et al., 2007) e, por consequência, ao processo de sobrevivência das células tumorais nos tecidos (SASI et al., 2012).

Outra citocina com importante papel no MaT é a IL-4, que induz a expressão do STAT-6 e a expressão do IL-4R α . Nos carcinomas mamários a IL-4 é responsável pela ativação de pelo menos 6 genes distintos para regular a expressão do STAT-6, o qual é capaz de ativar diversas vias que modificam o crescimento e a diferenciação celular, além de induzirem a resistência à apoptose (ZHANG et al., 2008).

A IL-10, de caráter imunossupressor, é hipersecretada na presença do TNF- α , via NF κ B (WEISS et al., 2004). Esta citocina além de suprimir uma resposta Th1 é ainda capaz de induzir uma disfunção estrutural reversível das moléculas MHC I. A deficiência destas moléculas facilita a progressão tumoral (MATSUDA et al., 1994), uma vez que os CTL não conseguem reconhecer os Ag tumorais sem a molécula de MHC I (GIGANTE; GESUALDO; RANIERI, 2012).

O INF- γ é uma citocina que quando expressa ativa o STAT-1, o qual sempre foi relacionado com atividade pró-imune Th1 e atividade anti-tumoral (LYNCH et al., 2007). Entretanto, esta interação INF- γ e STAT-1 vem sendo caracterizada de forma multifatorial, pois o STAT-1 tem sido relacionado também com muitos estágios tardios de cânceres em humanos, incluindo os carcinomas de glândula mamária. Este processo de regulação gênica envolve as vias sinalizadoras pelo INF- γ , o qual ainda é capaz de regular a expressão de uma série de outros genes nos estudos em cultura celular de carcinomas mamários (PEROU et al., 1999). Esta interação entre INF- γ e STAT-1 exerce um efeito de resposta anticitotóxica às células tumorais e eleva a expressão de TNF- α . Assim sendo, o STAT-1 induzido no MaT é capaz de desabilitar a resposta imune das células T contra o tumor. E para que esta função pró-tumoral

ocorra, parece que esta interação precise ocorrer de forma tardia no MaT, permitindo uma resposta inflamatória crônica, a qual não é efetiva contra as células tumorais. O STAT-1, quando ativado previamente, parece estar relacionado com uma resposta inflamatória aguda e com isso com uma maior resposta anti-tumoral (HIX et al., 2013).

A progressão da malignidade dos tumores mamários também está relacionada com a resposta inflamatória induzida no sítio tumoral. Os linfócitos infiltrados no tumor (TIL), em especial os linfócitos T infiltrantes no tumor (TIL_T), e outras células inflamatórias, tais como os TAMs, favorecem a progressão tumoral, uma vez que muitos carcinomas invasivos (como os carcinomas mamários) são altamente dependentes de fatores reguladores e de crescimento (por exemplo, as citocinas) produzidos tanto pelas células tumorais malignas quanto pelas células adjacentes (REOME et al., 2004).

Os TAMs apresentam uma plasticidade funcional, onde o fenótipo TAM é fortemente influenciado por diversos fatores dentro do MaT, favorecendo suas ações pró-tumorais (SICA et al., 2008). Desta forma, suas atividades pró ou anti-inflamatória, de destruição ou remodelamento celular, não são simultaneamente expressas, uma vez que é dependente do fenótipo predominante no local. Semelhante à nomenclatura de linfócitos Th1 e Th2, os macrófagos são polarizados em macrófagos do tipo 1 (M1) ou do tipo 2 (M2) (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005), expressando predominantemente receptores MHC I e MHC II, respectivamente (GORDON, 2003).

Os M1 são ativados pela chamada via clássica, isto é, por citocinas como o TNF- α e o IFN- γ , podendo este último estar associado ao lipopolissacarídeo (LPS) de micro-organismos (GORDON, 2003; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005). Os M1 são o fenótipo que mais se comportam como macrófagos apresentadores de antígenos, com maior efeito citotóxico através das espécies reativas de oxigênio, sendo potentes células antitumorais (SICA et al., 2008).

Os M2 são ativados, pela chamada via alternativa, constituída por várias citocinas, sendo as principais a IL-4 e IL-13, porém a IL-10 também pode estar envolvida (GORDON, 2003). Estes macrófagos são ainda sub-classificados em M2a, M2b e M2c, sendo ativados, por exemplo, pela IL-4 (M2a), por imuno-complexos (M2b) e pela IL-10 e TGF- β (M2c). Entre as diversas ações exercidas pelos M2 está a progressão tumoral (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005), principalmente por ser o

fenótipo fortemente relacionado à angiogênese pró-tumoral e remodelamento da MEC (SICA et al., 2008; HAO et al., 2012).

Relaciona-se ainda a atuação do NF κ B com os fenótipos M1 e M2, onde a ativação do NF κ B está presente em fenótipos M1, enquanto que sua inibição em fenótipos M2. Contudo, lesões pré-neoplásicas podem se aproveitar de um perfil M1 e da ativação do NF κ B para exacerbar a reação inflamatória local favorecendo o crescimento tumoral (SICA et al., 2008).

A ação celular dos CTLs pode estar anulada por diversas vias, entre elas a supressão de receptores da morte, ligados à família do TNF, como o TRAIL e seus domínios da morte, tornando as células tumorais livres da apoptose induzida pelos CTLs, além da supressão das moléculas de MHC I. O INF- γ pode também inibir o receptor de morte programada 1 (PD1) das células T, principalmente, as de caráter citotóxico, tornando estas células anérgicas, apesar de poderem ter sido ativadas no MaT (TÖPFER et al., 2001).

A imunossupressão do MaT permite a progressão e o crescimento do tumor. O TGF- β é outra citocina com perfil imunossupressor, tanto na resposta imune inata quanto adquirida. Na resposta imune inata esta citocina atua nos macrófagos, polarizando-os do fenótipo M1 para M2 e também inibe a atividade das células NK. Na resposta imune adquirida, o TGF- β estimula a diferenciação das células T CD4⁺ em Th2, além de também inibir a atividade dos CTL e estimular a diferenciação das células T regulatórias (Treg), as quais também mantém um perfil de diferenciação Th2 das células T CD4⁺ (HAO et al., 2012).

As células T reg são um subtipo de células T CD4⁺, que modulam os efeitos do sistema imune pela inibição da atividade de outras células T helper, células T citotóxicas, células B e células NK (RISSETO et al., 2010). No câncer há evidência de que as Tregs podem ser induzidas pelo tumor e suprimir a resposta do sistema imune aos antígenos tumorais (STANDISH et al., 2008).

Então, para driblar a constante imunovigilância do sistema imune do hospedeiro, as células carcinogênicas, por meio da regulação gênica na expressão dos diversos genes regulatórios, durante a fase de imunoedição, conseguem modificar tanto o ambiente tumoral quanto o metabolismo das células neoplásicas,

permitindo sua evasão do sistema imune do hospedeiro e, desta forma, seu crescimento e diferenciação (SMOLKOVA et al., 2011; VILLALBA et al., 2013).

2.3. Neoplasias da glândula mamária canina

Em cães os tumores mamários representam aproximadamente 50% de todas as neoplasias desta espécie (KUMARAGURUPARAN et al., 2006; KENNEDY & MILLER, 1993). Estes tumores são as principais neoplasias que acometem cadelas e mulheres (BENJAMIN et al., 1999; INOUE & SHIRAMIZU, 1999; MISDORP, 2002). Entretanto, a incidência de carcinomas mamários em cães é três vezes maior que em humanos (KUMARUGURUPAN et al., 2006).

A principal apresentação de cadelas com tumores mamários é a de um cão mais velho, independente de raça, não castrado ou que foi castrado tardiamente (SORENMO et al., 2011). Os tumores mamários são infreqüentes em cadelas com menos de cinco anos, salvo se apresentarem histórico de tratamento com hormônios, como a progesterona (SCHNEIDER, 1970; TAYLOR, 1976).

Normalmente, os cães com tumores mamários apresentam mais de uma mama acometida (SORENMO et al., 2011). Quando os tumores estão presentes em mais de uma glândula mamária ao mesmo tempo, são chamados de tumores multicêntricos, sendo ainda possível encontrar tumores com diferentes diagnósticos histopatológicos em uma única glândula mamária (MISDORP et al., 1999).

Tomando-se ainda uma avaliação macroscópica, os nódulos tumorais apresentam-se normalmente circunscritos, de tamanho e consistência variáveis e muitas vezes não estão aderidos à pele ou ao músculo. Ulcerações e reações inflamatórias locais podem ocorrer em um ou em vários tumores (MISDORP et al., 1999).

Muitas classificações têm sido propostas para que se chegue a um diagnóstico histopatológico que permitam o entendimento do comportamento tumoral (CASSALI et al., 2011). A primeira de todas as classificações oficiais internacionais foi publicada em 1974 no Boletim da Organização Mundial de Saúde (OMS) com o título original "International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals", baseada nos estudos de Misdorp et al. (1971), Misdorp et al. (1972) e Misdorp et al. (1973),

previamente publicadas na “Veterinary Pathology” (GOLDSCHMIDT, et al. 2011). Em 1999, Misdorp e colaboradores modificaram esta classificação. Desde as primeiras classificações muitos têm sido os esforços para a avaliação de critérios que estabeleçam uma padronização para o diagnóstico histopatológico (CASSALI et al., 2011). Com este fim, Cassali et al. (2011) estabeleceram critérios de diagnóstico histopatológico e diretrizes para a clínica oncológica, os quais pudessem ser um guia a todos os pesquisadores brasileiros e mais um método comparativo internacional.

Há outros critérios de avaliação que complementam o diagnóstico histopatológico, buscando-se estabelecer fatores prognósticos adicionais, como é o caso do sistema de avaliação tumor-linfonodo-metástase (TNM). O sistema TNM é um estadiamento clínico desenvolvido por Owen (1980) e publicado pela Organização Mundial de Saúde. Este sistema é utilizado apenas para os carcinomas e permite estabelecer um prognóstico, bem como um direcionamento para tratamentos futuros. O animal é classificado em estágios de I a IV e os parâmetros são referentes ao ambiente tumoral, tais como o tamanho do tumor; a presença de micrometástases em linfonodos regionais e a metastatização para sítios distantes, por exemplo, o pulmão.

Similar aos humanos, os cães desenvolvem tumores de mama de forma espontânea e apresentam carcinogênese e progressão tumoral acelerada. Estes animais têm maior tempo de vida em relação aos animais de laboratório, o que propicia acompanhamento clínico prolongado. Este perfil biológico permite que o cão seja um modelo experimental para o estudo de tumores mamários (PORRELLO et al., 2004). Outros aspectos como a maior incidência de tumores malignos, disseminação de metástases para o pulmão, fígado e outros órgãos, além do fator de risco referente ao aumento do período de exposição aos hormônios sexuais endógenos e exógeno também permitem um estudo comparativo importante (KUSEWITT; RUSH, 2007). A anatomia da glândula mamária canina por apresentar grandes semelhanças com a glândula mamária humana possibilita a associação entre o desenvolvimento tumoral e perspectivas terapêuticas entre as duas espécies, trazendo benefícios para ambas (WILLENBROCK et al., 2012).

O entendimento do sistema imune de forma comparada entre murinos, caninos e humanos vem permitindo um campo enriquecedor também para as pesquisas da

imunoterapia oncológica, podendo vir a desempenhar significativo papel no tratamento e/ou prevenção de pacientes humanos e veterinários (BERGMAN, 2010).

Embora muitos estudos existam a respeito da imunopatologia dos tumores mamários em mulheres, na veterinária faltam estudos nesta área, principalmente no MaT *in vivo*. Os poucos estudos sobre o perfil de citocinas existentes na literatura abordam as linhagens celulares de carcinomas mamários caninos e avaliações séricas, mas poucos estudos provêm de biópsias de tumores mamários caninos (GELALETI et al., 2012; KRÓL et al., 2012; ANDRÉS et al., 2013).

3. OBJETIVOS

Neste estudo, o objetivo geral foi comparar a expressão de citocinas e o perfil de células inflamatórias (TIL_T e TAM) predominantes no MaT com a malignidade dos tumores mamários em cadelas.

Os objetivos específicos foram:

- A quantificação relativa da expressão das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL-10 por meio da técnica quantitativa de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR);
- A imunomarcção dos TIL_T e TAM pela técnica de imuno-histoquímica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas amostras de tecido mamário de cadelas atendidas no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP. Um grupo controle foi composto por amostras de tecido mamário oriundo de cadelas sem tumor de mama, provenientes da rotina de necropsias do Departamento de Patologia Veterinária.

4.1. Triagem Clínica

Os animais atendidos no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP diagnosticados com tumores mamários realizaram radiografia de tórax no Serviço de Radiologia do mesmo hospital veterinário. Pelo menos duas projeções radiográficas, uma na posição ventro-dorsal e outra lateral direita ou esquerda, foram realizadas para a pesquisa de metástase pulmonar, previamente ao procedimento cirúrgico de mastectomia. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Serviço de Obstetrícia e Reprodução Animal, sendo, preferencialmente, o de mastectomia total unilateral e todas as amostras colhidas.

Uma ficha de entrevista (Apêndice A) foi elaborada para obter informações referentes à identificação do animal com um breve histórico clínico, tamanho e localização dos tumores, além de informações para contato com o proprietário para futuros acompanhamentos.

As neoplasias foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro e as medidas tomadas em centímetros (cm).

Outra informação coletada nesta etapa foi o tempo de evolução (TE), o qual correspondeu à primeira percepção de nódulos mamários pelo proprietário até o momento da consulta e o período foi computado em meses. Ainda em relação às observações de TE foi considerado o período de desenvolvimento tumoral de toda a cadeia mamária, uma vez que todas as amostras foram oriundas de cadeia mamária com tumores multicêntricos.

A alteração de crescimento (AC) correspondeu a dados referentes à observação do proprietário quanto a um rápido crescimento e/ou à ulceração do tumor nos últimos meses. A identificação da ulceração foi confirmada durante a avaliação clínica e as observações da AC foram tomadas como sim ou não.

4.2. Colheita das Amostras e Grupos Experimentais

A colheita das amostras ocorreu entre o período de março de 2011 até o período de setembro de 2012. As amostras foram colhidas imediatamente após a exérese cirúrgica para a realização das técnicas de histopatologia, imuno-histoquímica e qRT-PCR. Para este experimento foram incluídas para a análise apenas amostras de carcinomas simples, sendo, portanto, os dos tipos papilar, tubular e sólido, resultando em 33 amostras provenientes de 31 animais, as quais foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo 1 (G1):** 5 amostras controles. Este grupo foi definido pela ausência de tumores mamários e/ou mastites, diagnosticadas clínica e histopatologicamente
- **Grupo 2 (G2):** 3 adenomas;
- **Grupo 3 (G3):** 8 carcinomas papilares;
- **Grupo 4 (G4):** 11 carcinomas tubulares;
- **Grupo 5 (G5):** 6 carcinomas sólidos;
- **Grupo 6 (G6):** todas as amostras anteriores de carcinomas (G3 a G5).

Outro pré-requisito para a formação do número total de amostras foi o de obtê-las pareadas para a histologia, a imuno-histoquímica e o qRT-PCR. Por esta razão, foram colhidos apenas tumores maiores ou iguais a 1,0 cm.

4.3. Análise Histopatológica

Os fragmentos colhidos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (pH 7,4) e, após 24-48 horas, foram transferidos para álcool

70% e processados rotineiramente até a inclusão em parafina. Cortes de 5µm foram feitos em micrótomo e posteriormente corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE).

Os tumores foram então classificados de acordo com Cassali et al. (2011). Segundo a classificação adotada, os carcinomas antes classificados em túbulos-papilíferos por Misdorp (2002), foram reagrupados em carcinomas papilares ou tubulares. Assim, quando estes carcinomas exibiram mais de 60% de áreas com formações tubulares, foram classificados como carcinomas tubulares.

Por se tratar de um estudo na área de imunopatologia envolvendo o microambiente tumoral, tomou-se o cuidado de serem selecionadas amostras cujos tumores apresentaram ou um único tipo histopatológico na referida glândula mamária ou no máximo, dois tipos de carcinomas simples, tomando-se em consideração para a classificação o de pior prognóstico como sugerido por Cassali et al. (2011). Quando as amostras foram provenientes do mesmo animal, estas pertenciam ao mesmo tipo histopatológico.

A análise microscópica foi realizada em microscópio de luz Nikon Eclipse E200. Fotomicrografias digitais foram obtidas com auxílio da câmara de vídeo Moticom 2300.

4.4. Estadiamento clínico TNM

O sistema TNM avaliou 25 amostras de carcinomas mamários de um total de 24 animais (duas amostras de carcinoma tubular vieram do mesmo animal, porém pertenciam a glândulas mamárias distintas).

Como descrito por Owen (1980), os tumores foram avaliados individualmente e classificados seguindo a sequência de avaliação demonstrada nas Tabelas 1, 2, 3 e 4. Os animais foram, então, classificados nos escores conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 1. Mensuração do tumor primário (T).

Tumor primário (T)	Subclassificação e Características
T0	Sem evidência do Tumor primário
T1: Tumor menor que 3 cm	T1a: Não aderido T1b: Aderido à pele T1c: Aderido à musculatura
T2: Tumor entre 3 e 5 cm	T2a: Não aderido T2b: Aderido à pele T2c: Aderido à musculatura
T3: Tumor maior que 5 cm	T3a: Não aderido T3b: Aderido à pele T3c: Aderido à musculatura
T4: Tumor de qualquer tamanho	Apenas para carcinomas inflamatórios

Tabela 2. Avaliação dos linfonodos (N) regionais.

Linfonodos (N) regionais	Sub-classificação e Características
N0	Sem evidência de metástases nos linfonodos regionais
N1: Linfonodo ipsilateral envolvido	N1a: Não aderido N1b: Aderido
N2: Linfonodos bilaterais envolvidos	N2a: Não aderido N2b: Aderido

Tabela 3. Avaliação de metástases distantes (M).

Metástases distantes (M)	Características
M0	Sem evidência de metástases distantes
M1	Metástases distantes detectadas

Tabela 4. Estágio clínico dos animais de acordo com a classificação TNM (OWEN, 1980).

Estágio	T	N	M
I	Qualquer T1	N0, N1a ou N2a	M0
II	T0	N1	M0
	Qualquer T1	Qualquer N1	
	Qualquer T2	N0 ou N1a	
III	Qualquer T3	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer Nb	
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

4.5. Análise Imuno-histoquímica

Esta técnica foi realizada no laboratório de imuno-histoquímica do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal.

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

Passo 1: Desparafinização dos cortes de tecido de glândula mamária em estufa a 60°C por 1 hora. Seguido de banhos em soluções de xilol (I e II) por 10 minutos cada, seguido da bateria corrida de álcool (álcool absoluto I, II, III, 95% I, 95% II, 80% I e 80% II) para hidratação dos cortes. Em seguida os espécimes foram lavados 10 vezes em água destilada.

Passo 2: Recuperação antigênica para cada anticorpo (Tabela 5). Todos os cortes foram incubados com tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0), por 30 minutos.

Passo 3: Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio e metanol (30 v/v) a 8%, à temperatura ambiente, em câmara úmida por 30 minutos.

Passo 4: Bloqueio das proteínas inespecíficas com Proten Block Serum-Free (Dako, cód. X0909) por 30 minutos, à temperatura ambiente.

Passo 5: Incubação dos anticorpos por 18 horas a 4°C.

Passo 6: Anticorpos secundários (Tabela 5). Para cada reação a incubação foi realizada à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos.

Entre cada uma das etapas descritas fez-se banhos em água destilada e depois em tampão TRIS HCl, pH 7,4.

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

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

Tabela 5. Anticorpos utilizados para a imunomarcção dos linfócitos T e macrófago infiltrantes no tumor mamário canino.

AC 1 ^{rio}	Célula Alvo	Espécies de Origem	Local da Marcação	Diluição	Recuperação Antigênica	AC 2 ^{rio}
Anti-calprotectina	Macrófagos ¹	Anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG1 (Serotec, cód. MCA874G)	Intracitoplasmático	1:3.500	Banho Maria (Quimis, cód. Q-304-160) ²	LSAB ³
Anti-CD3	Linfócitos T	Anticorpo monoclonal de camundongo, isotipo IgG1 (Dako, cód. M7254)	Intracitoplasmático/membrana	1:350	Panela de pressão tipo Pascal (Dako, cód. S2800)	Advance ⁴

1- Segundo o fabricante também há marcação em granulócitos como os neutrófilos (os quais serviram como controle positivo interno) e monócitos por expressarem a proteína alvo proteína (L1). 2- Mantido a temperatura de 95°C 3- Complexo Estreptavidina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690-1). 4- Complexo de Polímeros ligados a peroxidase (Kit Advance HRP®, Dako Cytomation, código K406889-2).

Os linfonodos regionais (linfonodos inguinais) serviram como controle positivo, enquanto que os controles negativos para as imunomarcações foram realizados com o diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário.

A determinação da densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada pela contagem das células nas áreas que apresentaram maior imunomarcção (“hot spot”) em cinco fotomicrografias (área=0,032 mm²) de campos de grande aumento em microscópio de luz (Nikon, E200). Os campos foram fotomicrografados com auxílio da câmera de vídeo Moticam 2300 e as

fotomicrografias analisadas pelo programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, 2006). As células imunomarcadas foram expressas em porcentagem de células por campo.

4.6. Colheita das amostras e Técnica de RT-PCR em Tempo Real

Amostras de tumores mamários das cadelas, destinadas à técnica de qRT-PCR, foram colhidas imediatamente após a exérese cirúrgica da cadeia mamária. As mamas do grupo controle foram colhidas imediatamente após a eutanásia dos animais não neoplásicos e encaminhados ao Serviço de necropsia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

Foram colhidas aproximadamente 1,0 grama de amostras de tecido mamário as quais foram embebidas em solução comercial RNAlater (Qiagen, cód. 76104) para preservação do RNA e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para transporte. As amostras foram então armazenadas em freezer a -80 °C até o processamento das mesmas.

As etapas seguintes foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Virologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal.

4.6.1. Extração de RNA total

O procedimento de extração de RNA total das amostras de glândula mamária foi realizado com o kit comercial InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Unisciense, cód. 1062100200), seguindo as recomendações do fabricante. Para este kit o tratamento com a enzima DNase não é requerido.

Para a extração é necessário aproximadamente 20 mg de tecido das amostras de glândula mamária neoplásicas ou controle, que foram então primeiramente maceradas em nitrogênio líquido até se tornarem um fino pó. A lise do tecido das amostras foi concluída adicionando-se 600 µL da solução de lise do kit, utilizando-se um micropistilo e um microtubo. Em seguida 10 grânulos de Zircônia foram adicionados na amostra, na proporção grânulos de Zirconia I (pequenos):grânulos de Zirconia II (grandes) = 2:1. Procedeu-se a homogeneização por agitação contínua.

Para a remoção do DNA genômico e dos grânulos de Zircônia o material lisado foi centrifugado a 16.000 rpm por 2 minutos a 4°C (todas as etapas de centrifugação descritas a seguir foram mantidas a esta temperatura). Após, transferiu-se 500 µL do sobrenadante para o *Receiver tube* sendo adicionados 330 µL de etanol 96-100%.

A próxima etapa consistiu na ligação do RNA total à membrana do *RNA Spin Filter* e para tanto os 830 µL da amostra com etanol eram transferidas para este microtubo e incubadas por 1 minuto sendo posteriormente, centrifugadas por 1 minuto a 10.500 rpm.

Seguiram-se três lavagens, onde na primeira foram adicionados 500 µL do primeiro tampão de lavagem (*Wash Buffer 1*) e centrifugado por 1 minuto a 10.500 rpm, descartando-se o sobrenadante. A segunda lavagem foram adicionados 700 µL do segundo tampão de lavagem (*Wash Buffer 2*) centrifugado à mesma maneira da primeira lavagem. A última lavagem foi uma repetição da segunda.

Para eliminar qualquer vestígio do etanol o *RNA Spin Filter* foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 rpm. Para finalizar, este microtubo foi transferido para um tubo de eluição livre de RNase aonde foram adicionados 30 µL do tampão de eluição (*Elution Buffer R*), incubado por 2 minutos e centrifugado por 1 minuto a 10.500 rpm. O *RNA Spin Filter* foi descartado e o RNA total eluído de cada amostra foi armazenado imediatamente no gelo para ser em seguida processado na etapa de transcrição reversa.

O controle da qualidade do RNA extraído, de quatro amostras aleatórias, foi realizado por meio de um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000), em que a relação de absorbância A260/A280 da amostra deve estar entre 1,8 e 2,1. Abaixo do valor inferior a amostra é considerada com presença de contaminantes. As amostras analisadas apresentaram os valores referentes a 1,82; 1,94; 2,07 e 2,01 ratificando a devida qualidade do RNA.

4.6.2. Transcrição Reversa (RT)

É a reação que permite que um mRNA seja transcrito a uma fita complementar de DNA (cDNA) pela ação da enzima transcriptase reversa.

A cada ciclo de aquecimento e resfriamento eram adicionadas soluções denominadas mix e enumeradas de acordo com cada ciclo, tendo assim mix I, mix II e mix III. Estes mixes eram preparados poucas horas antes da extração.

O volume final da reação de RT foi de 20 μ L por amostra e os produtos obtidos foram imediatamente armazenados a -20°C para posterior reação em técnica de PCR em tempo real com os primers selecionados.

Os componentes adicionados em cada mix e o volume final de cada etapa estão dispostos na Tabela 6.

A reação de transcrição reversa foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cyclers (MJ Research).

Tabela 6. Componentes dos mix I, mix II e mix III e volume adicionado por reação.

	Componente Adicionado	Volume adicionado por reação
Componentes do Mix I	H ₂ O DEPC	3 µL
	dNTP 0,5 mM (Invitrogen, cód.1827013)	1 µL
	Oligo(dT)12–18 Primer (Invitrogen, cód. 18418012)	1 µL
Volume final 1		5 µL
	RNA eluído da amostra	5 µL
Volume final 2 (Mix I total¹)		10 µL
Componentes do Mix II	H ₂ O DEPC	2 µL
	RT Buffer 5x (Invitrogen, cód. 18057-018)	4 µL
	DTT (Invitrogen, cód.D-1532)	2 µL
	RNAse OUT (Invitrogen, cód. 10777-019)	1 µL
	Volume Final 1	
	Mix I total	10 µL
Volume final 2 (Mix II total²)		19 µL
Componentes do Mix III	H ₂ O DEPC	0,75 µL
	SuperScript (Invitrogen, cód. 18080044)	0,25 µL
	Volume final 1	1 µL
	Mix II total	19 µL
Volume final 2 (Mix III total³)		20 µL

1- Temperatura/tempo de incubação no ciclo I: 65°C/5 minutos. 2- Temperatura/tempo de incubação no ciclo II: 45°C/2 minutos. 3- Temperatura/tempo de incubação no ciclo II: 45°C/2 minutos.

4.6.3. PCR em tempo real

Primers

Os *primers* específicos para as citocinas de cães e do gene constitutivo foram sintetizados pela empresa Sigma Aldrich e suas sequências encontram-se depositadas no GeneBank. Estes primers foram previamente definidos e avaliados por Peters et al. (2005), tornando-se um modelo para escolha das sequências das citocinas. Todas as informações quanto ao código de acesso destes *primers* no GeneBank, suas sequências e temperatura e tempo de anelamento podem ser visualizadas na Tabela 7.

Tabela 7. Código de acesso ao GeneBank com a sequência de pares de bases e sua temperatura de anelamento de acordo com o estudo de Peters, et al. (2005).

Conjunto de Primers	Cód. GeneBank	Forward <i>Primer</i> (5'-3')	Reverse <i>Primer</i> (5'-3')	Anelamento (°C)
G3PDH	AB022763	5'-TCAACGGATTTGGCCGTATTGG-3'	5'-TGAAGGGGTTCATTGATGGCG-3'	60 °C
TNF- α	Z70046	5'-CTGGAGTCGTGAGGCAGTG-3'	5'-AGGGCTCTTGATGGCAGAGA-3'	60 °C
IL-10	U33843	5'-CGACCCAGACATCAAGAAACC-3'	5'-CACAGGGAAGAAATCGGTGA-3'	60 °C
IL-4	AF187322	5'-GCTCCAAGAACAACAAGCGA-3'	5'-CATGCTGCTGAGGTTCTGT-3'	60 °C
IFN- γ	AF126247	5'-TCAACCCCTTCTCGCCACT-3'	5'-GCTGCCTACTTGGTCCCTGA-3'	60 °C

Técnica

Para o método de qRT-PCR foi utilizado o marcador SYBR Green I (Kapa Biosystems, 4309155), sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador Chromo 4 - PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

Foi utilizado aproximadamente 50ng de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 10,0 µL da mistura KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS, KK4600), 10 pmol de cada “primer”, completando-se com água para um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2 mL com as tampas apropriadas para leitura óptica, o que é requerido pelo sistema de detecção e mensuração fotométrica desse equipamento de PCR em tempo real.

Quantificação Relativa

A quantificação relativa da expressão gênica das citocinas foi realizada conforme o método matemático $2^{-\Delta\Delta C_T}$ descrito por LIVAK e SCHMITTGEN (2001), sendo a expressão de cada gene normalizada em relação ao gene G3PDH, utilizando-se como nível basal de expressão gênica as amostras provenientes das mamas do grupo controle.

O perfil térmico da PCR foi constituído por um primeiro ciclo de 95°C por três minutos, seguindo-se de mais 45 ciclos, com exceção daquele usado para a reação com o par de oligonucleotídeos codificadores do gene G3PDH, no qual foram requeridos 35 ciclos, compostos por desnaturação a 95°C por 3 segundos, anelamento por 30 segundos a 60°C, e extensão a 72°C por 3 segundos. Ao final dessa etapa, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C para a avaliação da temperatura média de dissociação (T_m), e as leituras efetuadas a cada 0,2°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

4.7. Acompanhamento dos Animais

Os animais dos quais as amostras foram obtidas passaram por avaliações para verificação do número de sobreviventes e mortos devido aos carcinomas de mama com a data limite referente à primeira quinzena de março de 2013, perfazendo-se um período máximo de até dois anos de acompanhamento. Foram desconsiderados os

óbitos sabidamente decorrentes de outras causas que não da progressão dos carcinomas mamários.

4.8. Análise Estatística

Para a análise estatística confrontou-se a expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10, além do infiltrado leucocitário de macrófagos e linfócitos T no tecido mamário de cadelas entre os grupos experimentais, através de análise de variância, utilizando-se como teste de médias, contrastes ortogonais, com nível de significância de 5%.

Para as provas de normalidade e homocedasticidade foram realizados os testes de Cramer von Mises e Brown-Forsyth, respectivamente. Quando as pressuposições da análise de variância não foram satisfeitas, os dados sofreram transformações de acordo com o proposto por Bartlett (1947).

O coeficiente de correlação de Spearman (ρ) foi empregado para a análise de correlação entre as variáveis das citocinas, leucócitos, TE, AC, TNM e animais vivos. A correlação só foi considerada quando apresentou $p < 0,05$. Para este estudo, quando ρ for $\leq 0,39$, a correlação foi considerada fraca, para $\rho \geq 0,40$ e $\leq 0,64$ a correlação foi considerada média e para $\rho \geq 0,65$, foi considerada forte. Correlações com números positivos indicam correlações diretamente proporcionais, com números negativos indicam correlações inversamente proporcionais.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAS 9.0.

5. RESULTADOS

5.1. Histopatologia e Imuno-histoquímica

A avaliação dos cortes processados para a análise histopatológica permitiu a classificação das amostras em seus respectivos grupos experimentais. Fotomicrografias do grupo controle (Figura 2) demonstram os fragmentos da glândula mamária livres de neoplasia ou mastite. Fotomicrografias das classificações histopatológicas dos tumores mamários caninos, de acordo com Cassali et al. (2011), estão expostas nas Figuras 3 e 4.

A análise histopatológica em HE também demonstrou que os TAMs e TIL_{Ts} presentes encontravam-se em região peritumoral ou entremeados próximos a ductos e vasos. Contudo, na presença de necrose, principalmente quando havia histórico de ulceração da massa tumoral, o mesmo infiltrado avançava em direção à epiderme.

O mesmo infiltrado observado nos cortes processados em HE foi confirmado pela imuno-histoquímica, onde os TAMs e os TIL_{Ts} imunomarcados podem ser visualizados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

5.2. Análise por contrastes ortogonais entre as citocinas e os grupos experimentais

5.2.1. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL_{Ts} entre o grupo dos adenomas (G2) e o grupo controle (G1)

A análise por contrastes ortogonais demonstrou que expressão de RNAm da citocina TNF- α foi maior e estatisticamente significativa no G1 em relação G2 ($p < 0,0064$ / Tabelas 8 e 9; Figuras 7 e 8). O G2 apresentou uma expressão de RNAm de IL-4 ligeiramente maior que para o G1, porém não houve diferença significativa ($p > 0,05$ / Tabelas 8 e 9; Figuras 7 e 8). Para a expressão de RNAm da IL-10 o grupo G2 apresentou expressão um pouco maior, mas não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$). A citocina INF- γ apresentou expressão de RNAm menor no G2 em relação a G1. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$ / Tabelas 8

e 9; Figuras 7 e 8). A densidade de TAMs e TIL_Ts de G2 foi maior quando comparada a G1. Entretanto, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos para nenhum dos leucócitos (Tabelas 8 e 9 e Figuras 7 e 8).

5.2.2. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL_Ts do grupo dos carcinomas (G6) em relação ao grupo controle (G1) e ao grupo dos adenomas (G2)

A expressão de RNAm da citocina TNF- α foi maior e estatisticamente significativa no G6 em relação a G1 ($p<0,0001$) e a G2 ($p<0,0012$), como pode ser observado na Tabela 9 e Figura 8. A expressão de RNAm de IL-4 do G6 também foi maior e estatisticamente diferente de G1 ($p<0,0066$) e G2 ($p<0,0134$), Tabela 9 e Figura 8. O G6 apresentou maior expressão de RNAm para a IL-10, mostrando diferença estatística significativa, em relação a G1 ($p<0,0020$) e G2 ($p<0,0073$), Tabela 9 e Figura 8. A expressão de RNAm de INF- γ em G6 foi ligeiramente maior que em G1 e G2, porém não apresentou diferença estatística significativa ($p>0,05$), Tabela 9 e Figura 8. Para a densidade de TAMs imunomarcados, o grupo G6 apresentou um percentual de células maior do que em relação a G1 e G2, porém apenas diferiu significativamente de G1 ($p<0,0045$), Tabela 9 e Figura 8. A densidade de TIL_Ts imunomarcados do grupo G6 também foi maior do que em G1 e G2 e, novamente, houve apenas diferença significativa com G1 ($p<0,0001$).

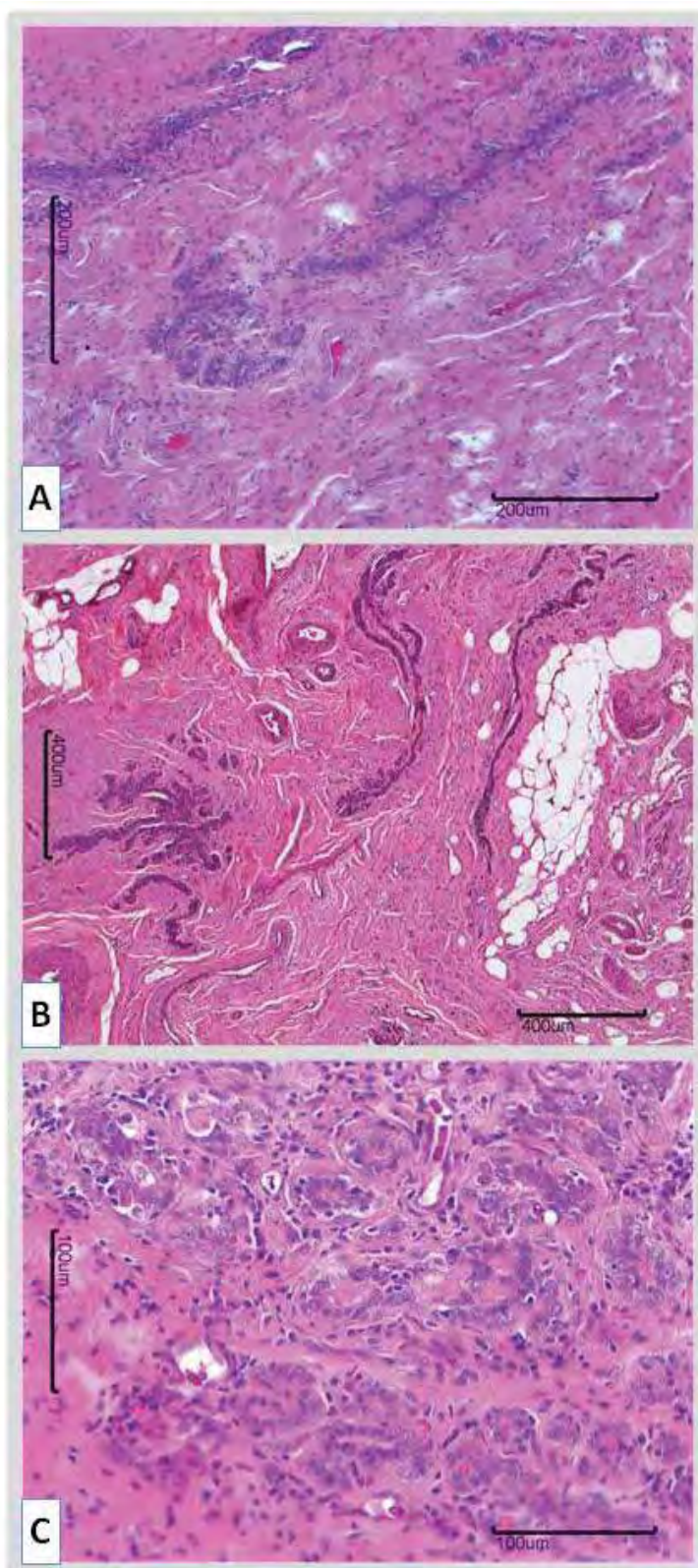


Figura 2. A, B e C: Fotomicrografias de fragmentos de mama de cadelas do grupo controle, não acometidas por neoplasia mamária ou mastite (bar=200µm; 400µm e 100µm, respectivamente). Hematoxilina e Eosina.

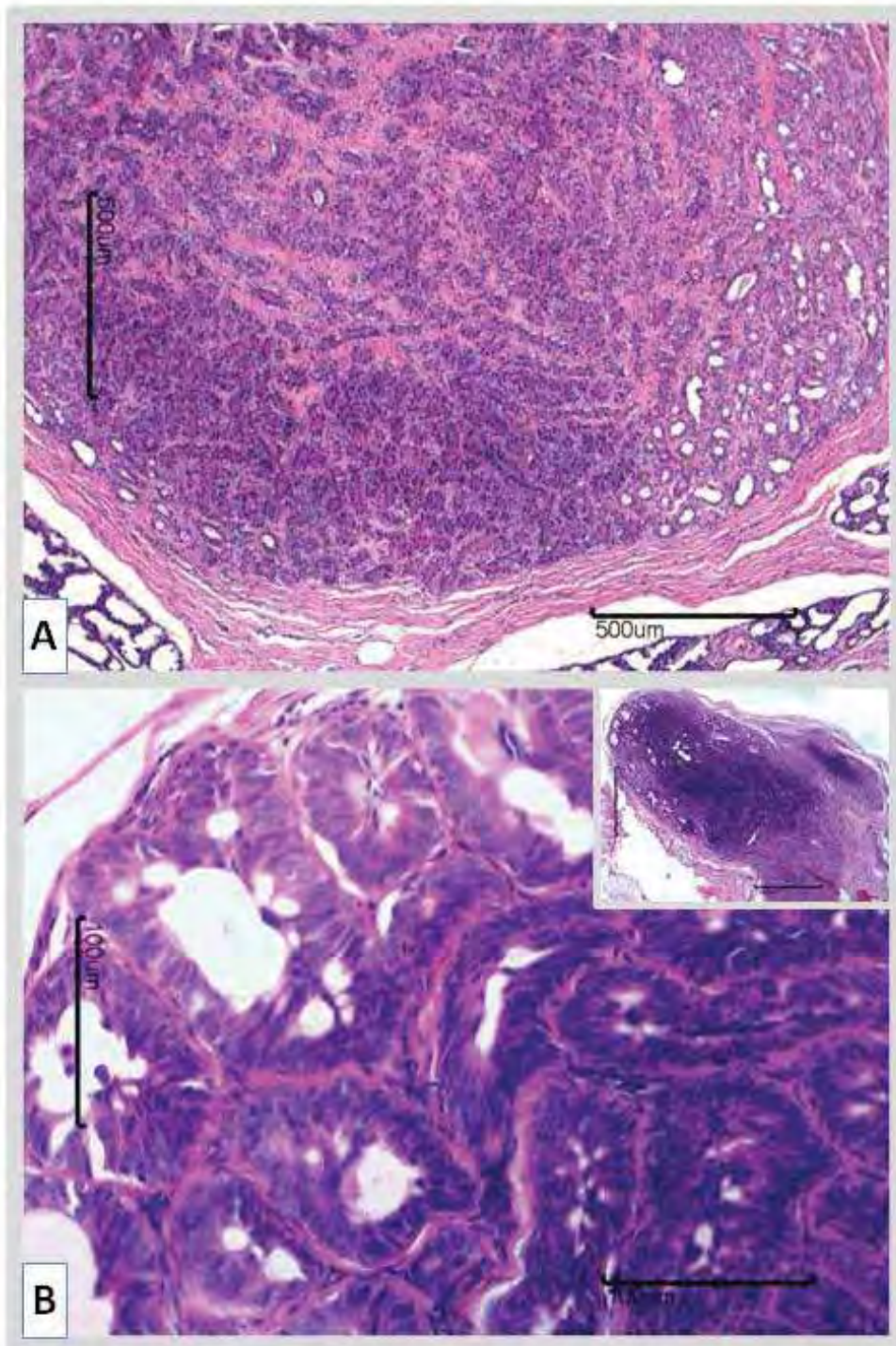


Figura 3. Fotomicrografias de glândula mamária de cadelas apresentando adenoma. A) Notar a circunscrição do nódulo, bem definido e sem projeções (bar=500µm). B) Arquitetura tecidual organizada e baixo pleomorfismo celular (bar=100µm). Detalhe: Notar nódulo bem delimitado (bar=500µm). Hematoxilina e Eosina.

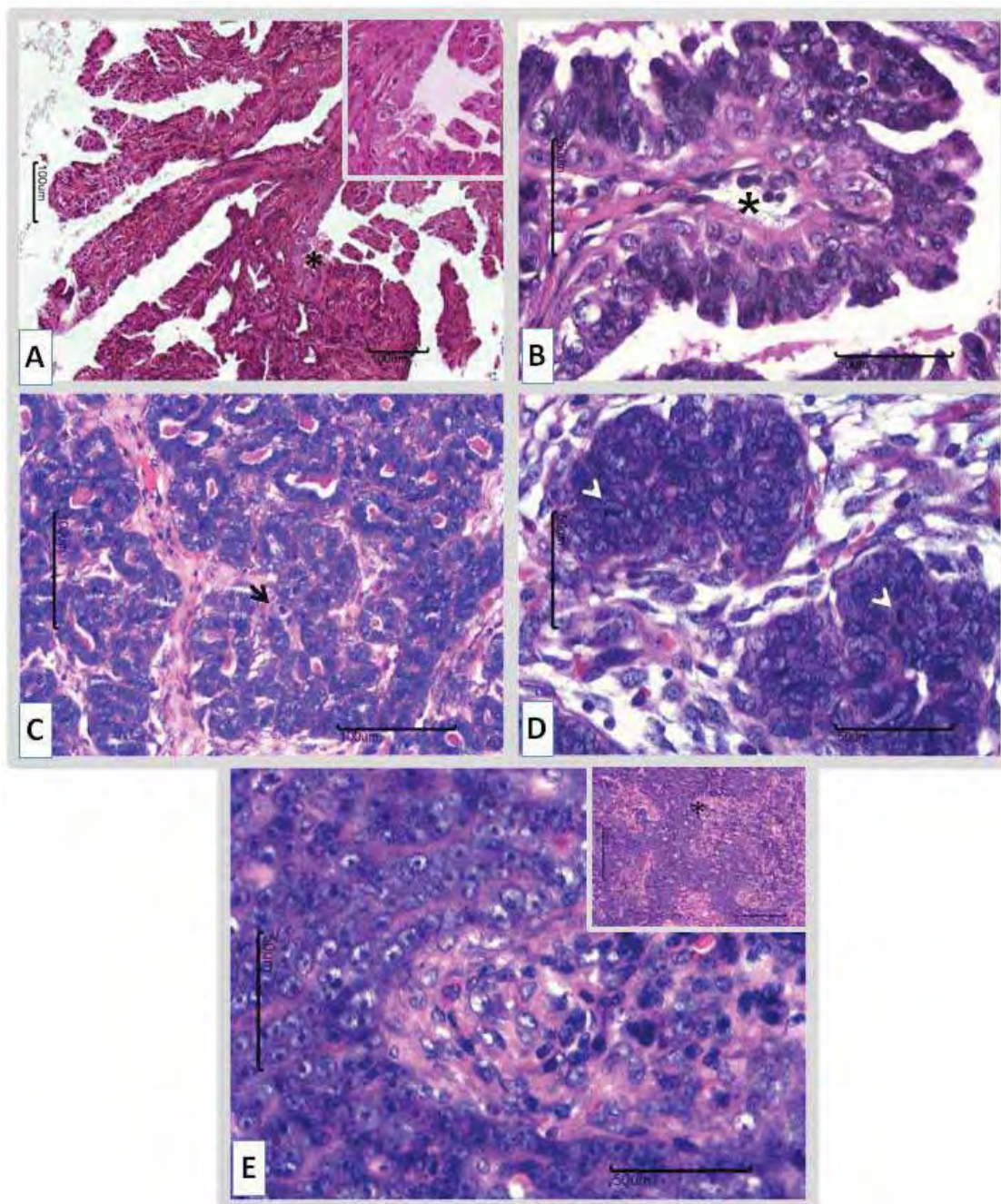


Figura 4. Fotomicrografias de fragmentos de glândula mamária de cadelas apresentando três tipos histológicos de carcinoma simples. A) Carcinoma Papilar (Bar=100µm). Notar as projeções digitiformes. No detalhe observar a área com desarranjo celular e moderado pleomorfismo das células epiteliais. B) Carcinoma Papilar (bar=50µm). Observar moderado pleomorfismo das células epiteliais e presença de linfócitos infiltrando o tumor (*). C) Carcinoma Tubular (bar=100µm). Observar as formações tubulares com mais de uma camada de células epiteliais neoplásicas e figuras de mitose (seta). D) Carcinoma tubular (bar=50µm). Notar figuras mitóticas (cabeça de seta) e alguns linfócitos infiltrantes no tumor. E) Carcinoma sólido (bar=50µm). Observar o elevado pleomorfismo celular e infiltrado inflamatório adjacente. Detalhe: visualizar os cordões celulares de células epiteliais neoplásicas (bar=200µm). Hematoxilina e Eosina.

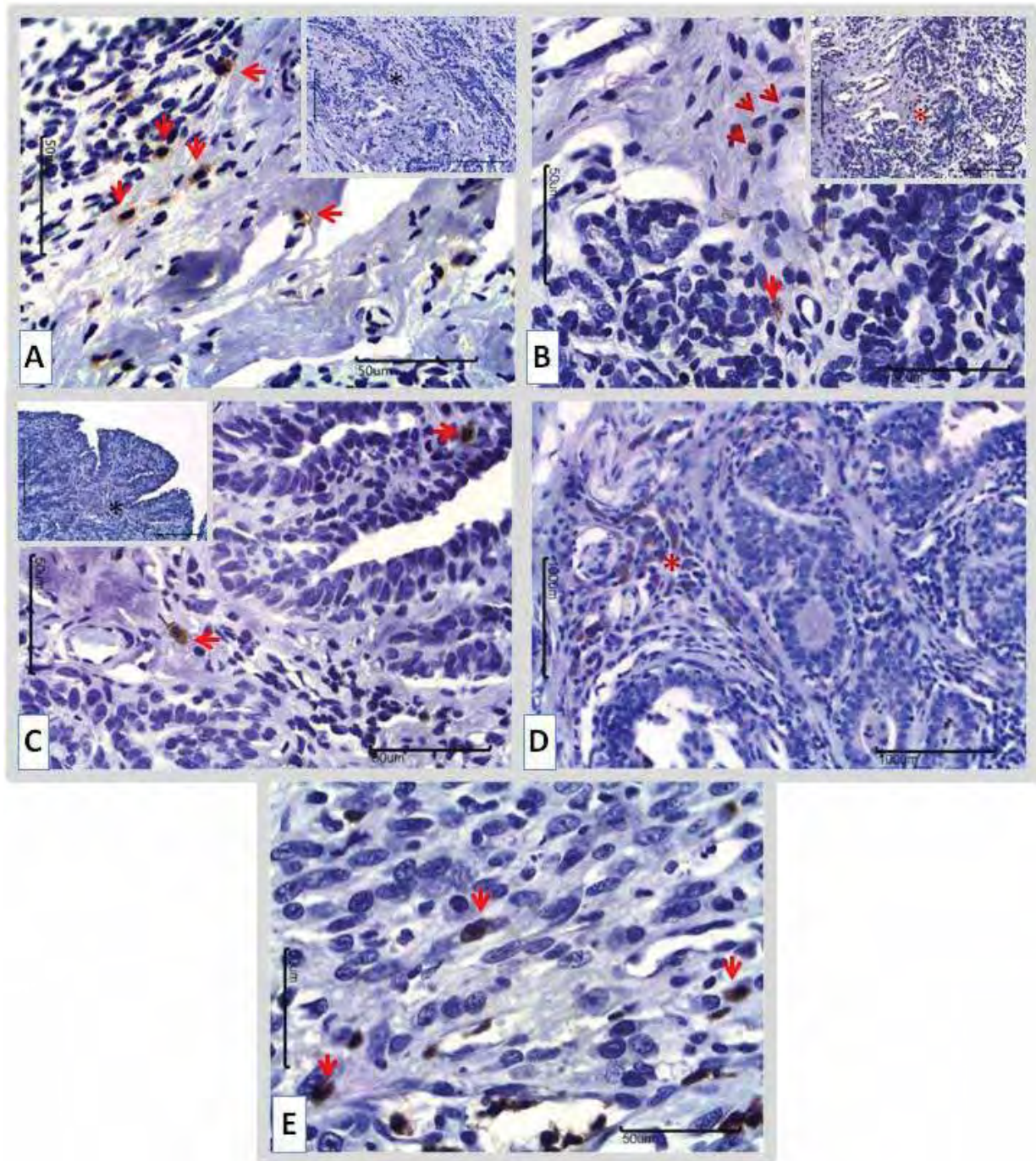


Figura 5. Fotomicrografias de tecido mamário canino imunomarcadas com anticorpo anti-macrófagos. A) Tecido mamário normal, área com macrófagos imunomarcados (setas/bar=50µm). Detalhe: região de imunomarcção (*bar=100µm). B) Adenoma, área com macrófagos imunomarcados (setas/bar=50µm). Detalhe: região de imunomarcção, adjacente ao tumor (*bar=100µm). C) Carcinoma papilar, notar macrófagos imunomarcados (setas/bar=40µm). Detalhe: região de imunomarcção (*bar=100µm). D) Carcinoma tubular, apresentando imunomarcção para macrófagos (*bar=100µm). E) Carcinoma sólido com presença de macrófagos imunomarcados (setas/bar=50µm). Marcação com Complexo Streptavidina Biotina - Peroxidase.

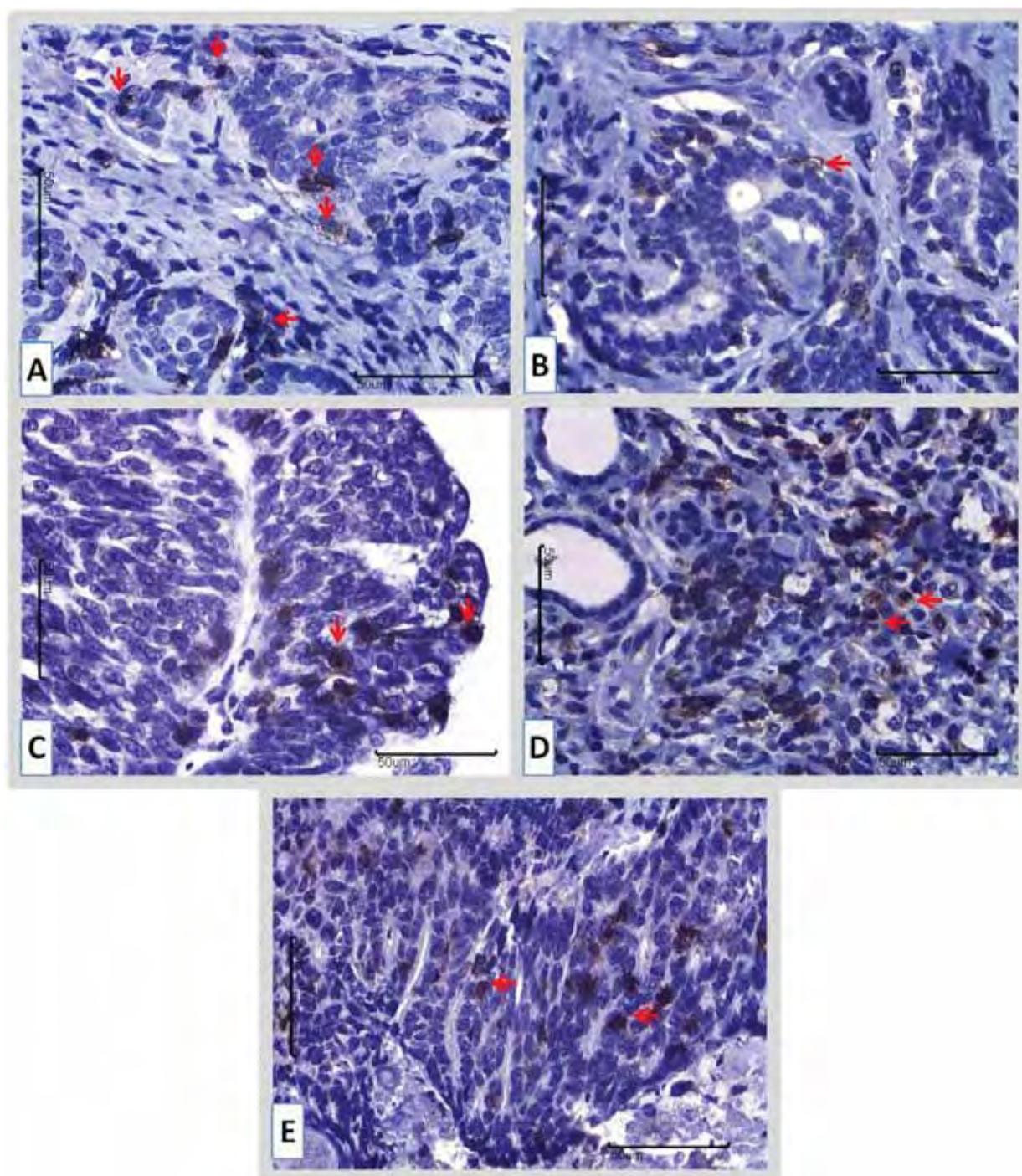


Figura 6. Fotomicrografias de tecido mamário imunomarcadas com anticorpo anti-CD3. A) Tecido mamário normal apresentando linfócitos T imunomarcados (setas/bar=50µm). B) Adenoma, presença de linfócitos T imunomarcados no infiltrado inflamatório peritumoral (setas/bar=50µm). C) Carcinoma papilar, mostrando região de imunomarcção entremeada no tecido neoplásico (setas/bar=50µm). D) Carcinoma tubular, região peritumoral de imunomarcção (setas/bar=50µm). E) Carcinoma sólido com linfócitos T imunomarcados (setas/bar=50µm). Marcação com Complexo de Polímeros ligados a peroxidase.

5.2.3. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL_{Ts} entre os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas sólidos (G5)

Com relação à expressão de RNAm de TNF- α o grupo G4 apresentou maior expressão, seguido de G3 e depois G5, havendo diferença estatística somente entre G3 e G4 ($p < 0,0274$), Tabela 8 e Figura 7. Para a expressão da IL-4 houve maior expressão de RNAm de G5, seguido de G4 e depois G3, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,05$), Tabela 8 e Figura 7. A IL-10 apresentou maior expressão de RNAm para G4, seguido de G3 e depois G5. Entretanto, os grupos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), Tabela 8 e Figura 7. Para a expressão de RNAm de INF- γ houve uma expressão ligeiramente maior de G5, seguido de G4 e depois G3, mas os grupos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles (Tabela 8 e Figura 7). Embora as densidades de TAMs e TIL_{Ts} tenham sido maiores no grupo G3, seguido por G4 e G5, não houve diferença significativa entre os grupos, com $p > 0,05$ (Tabela 8 e Figura 7).

5.2.4. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL_{Ts} entre o grupo controle (G1) e os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas sólidos (G5)

O grupo G1 apresentou menor expressão de RNAm com relação aos grupos G3, G4 e G5, com $p < 0,0001$, Tabela 8 e Figura 7. Para a expressão de IL-4 o grupo G1 apresentou menor expressão de RNAm desta citocina em relação a G3, G4 e G5. Entretanto, só houve diferença estatística significativa entre G4 ($p < 0,0115$) e G5 ($p < 0,0054$), Tabela 8 e Figura 7. O grupo G1 apresentou menor expressão de RNAm para a citocina IL-4 com relação aos grupos G3, G4 e G5. Porém G1 apresentou diferença significativa apenas com G4 e G5, com $p < 0,0115$ e $p < 0,0054$, respectivamente (Tabela 8 e Figura 7). A expressão de RNAm de INF- γ foi menor para G1 em relação a G3, G4 e G5, mas não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,005$), Tabela 8 e Figura 7. A densidade de TAMs e TIL_{Ts} foi menor no grupo G1 com relação a G3, G4 e G5, e a densidade de TAMs/TIL_{Ts} apresentaram

diferença significativa entre todos os grupos com $p < 0,0043/p < 0,0001$; $p < 0,0103/p < 0,0001$; e $p < 0,0387/p < 0,0178$, respectivamente (Tabela 8 e Figura 7).

5.2.5. Expressão de TNF- α , IL-4, IL-10 e INF- γ e densidade de TAMs e TIL_Ts entre o grupo dos adenomas (G2) e os grupos dos carcinomas papilares (G3), carcinomas tubulares (G4) e carcinomas sólidos (G5)

A expressão de RNAm de TNF- α do grupo G2 foi menor quando comparado a G3, G4 e G5, havendo diferença estatística significativa do grupo G2 com os demais (G3, $p < 0,0124$; G4, $p < 0,0001$; G5, $p < 0,0107$), Tabela 8 e Figura 7. O grupo G2 apresentou menor expressão de RNAm para a citocina IL-4 em relação a G3, G4 e G5, porém só houve diferença significativa entre G2 com G4 ($p < 0,0196$) e G5 ($p < 0,0090$), Tabela 8 e Figura 7. A citocina IL-10 apresentou menor expressão de RNAm no grupo G2, em relação a G3, G4 e G5. No entanto, G2 apenas diferiu estatisticamente de G3 ($p < 0,0061$) e G4 ($p < 0,0051$), Tabela 8 e Figura 7. A expressão de RNAm de INF- γ foi menor no grupo G2 com relação aos grupos G3, G4 e G5, mas não houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p > 0,005$), Tabela 8 e Figura 7. A densidade de TAMs e TIL_Ts foi menor no grupo G2 com relação a G3, G4 e G5, mas não houve diferença significativa entre os grupos, com $p > 0,005$ (Tabela 8 e Figura 7).

Tabela 8. Médias e erro-padrão da média de TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos e linfócitos T em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinomas papilar (G3), tubular (G4) e sólido (G5).

Variável Grupo	TNF- α ¹	IL-4 ¹	IL-10 ¹	IFN- γ ¹	Macrófagos ²	Linfócitos ²
Controle	0,54±0,22 A	2,35±0,52 A	3,19±1,98 A	0,70±0,27 A	0,96±0,09 A	1,56±0,33 A
Adenoma	25,70±19,72 B	2,53±0,93 A	8,21±7,39 A	0,23±0,08 A	2,87±1,01 AB	9,22±2,11 B
Carcinoma Papilar	405,38±145,52 CD	6,93±1,54 AB	43,52±11,56 B	0,68±0,14 A	4,44±1,15 B	12,67±1,07 B
Carcinoma Tubular	1132,18±278,99 D	11,16±2,58 B	85,18±25,17 B	1,02±0,24 A	3,67±0,89 B	11,61±1,67 B
Carcinoma Sólido	202,14±58,28 C	12,57±3,45 B	35,18±20,31 AB	1,15±0,32 A	3,26±1,24 B	7,30±2,49 B

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de contraste ortogonal. Nível de significância de 5%. 1- Valores obtidos por qRT-PCR; A expressão gênica relativa foi normalizada com o gene constitutivo G3PDH. 2- Porcentagem de células imunomarcadas por campo (%).

Tabela 9. Análise de médias e erro-padrão da média de TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos e linfócitos T em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinoma mamário (G6).

Variável	TNF- α ¹	IL-4 ¹	IL-10 ¹	IFN- γ ¹	Macrófagos ²	Linfócitos T ²
Controle	0,54±0,22 A	2,35±0,52 A	3,19±1,98 A	0,70±0,27 A	0,96±0,09 A	1,56±0,33 A
Adenoma	25,70±19,72 B	2,53±0,93 A	8,21±7,39 A	0,23±0,08 A	2,87±1,01 AB	9,22±2,11 B
Carcinoma	631,47±145,50 C	10,14±1,50 B	59,85±13,06 B	0,94±0,14 A	3,81±0,59 B	10,49±1,08 B

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de contraste ortogonal. Nível de significância de 5%. 1- Valores obtidos por qRT-PCR; A expressão gênica relativa foi normalizada com o gene constitutivo G3PDH. 2- Porcentagem de células imunomarcadas por campo (%).

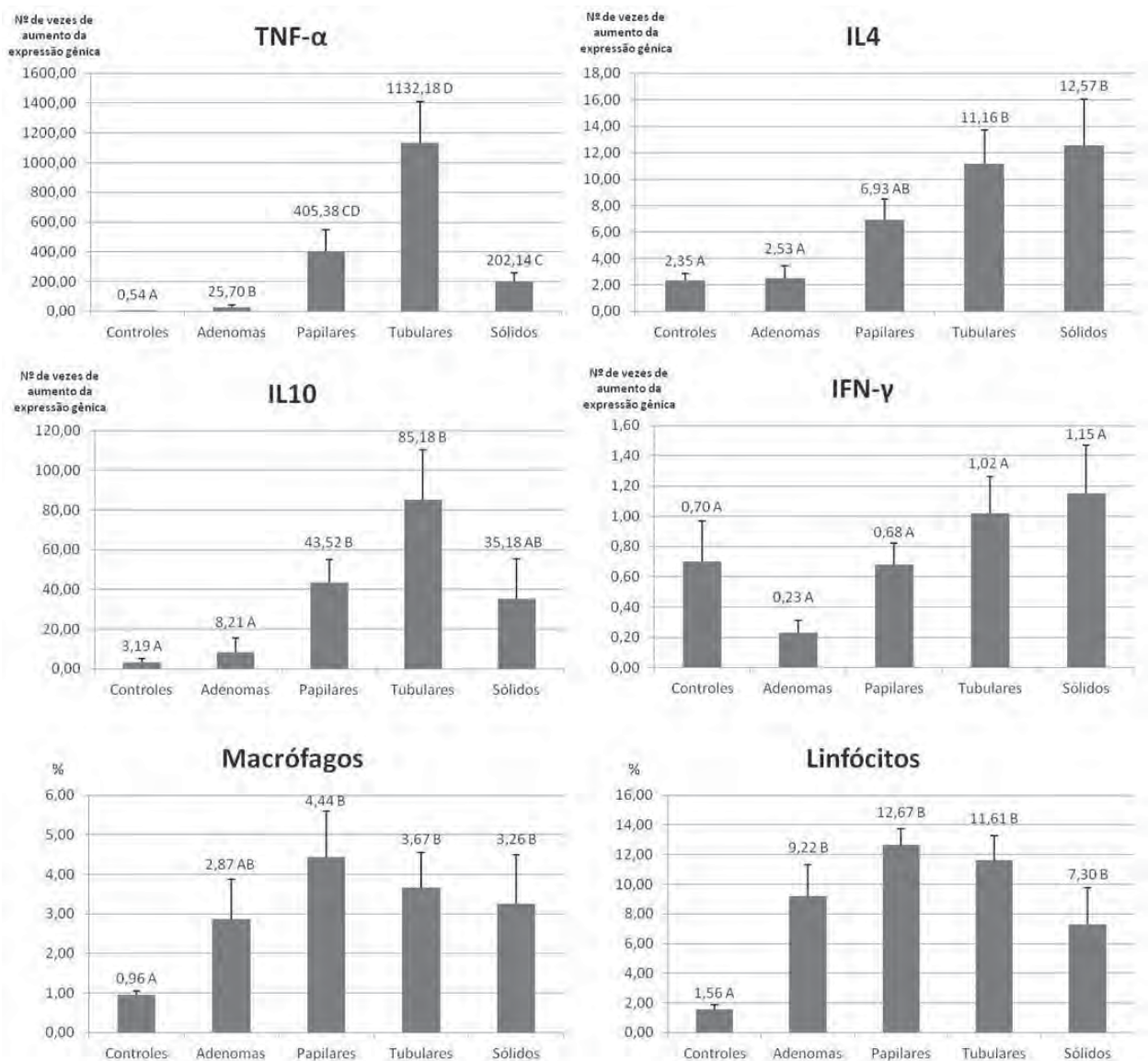


Figura 7. Médias dos grupos controle (G1), adenoma (G2) e carcinomas papilar (G3), tubular (G4) e sólido (G5) para as variáveis TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos (MAC) e linfócitos T (LINF) e suas respectivas diferenças estatísticas (letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos si pelo teste de contraste ortogonal. Nível de significância de 5%). A expressão gênica relativa foi normalizada com o gene constitutivo G3PDH.

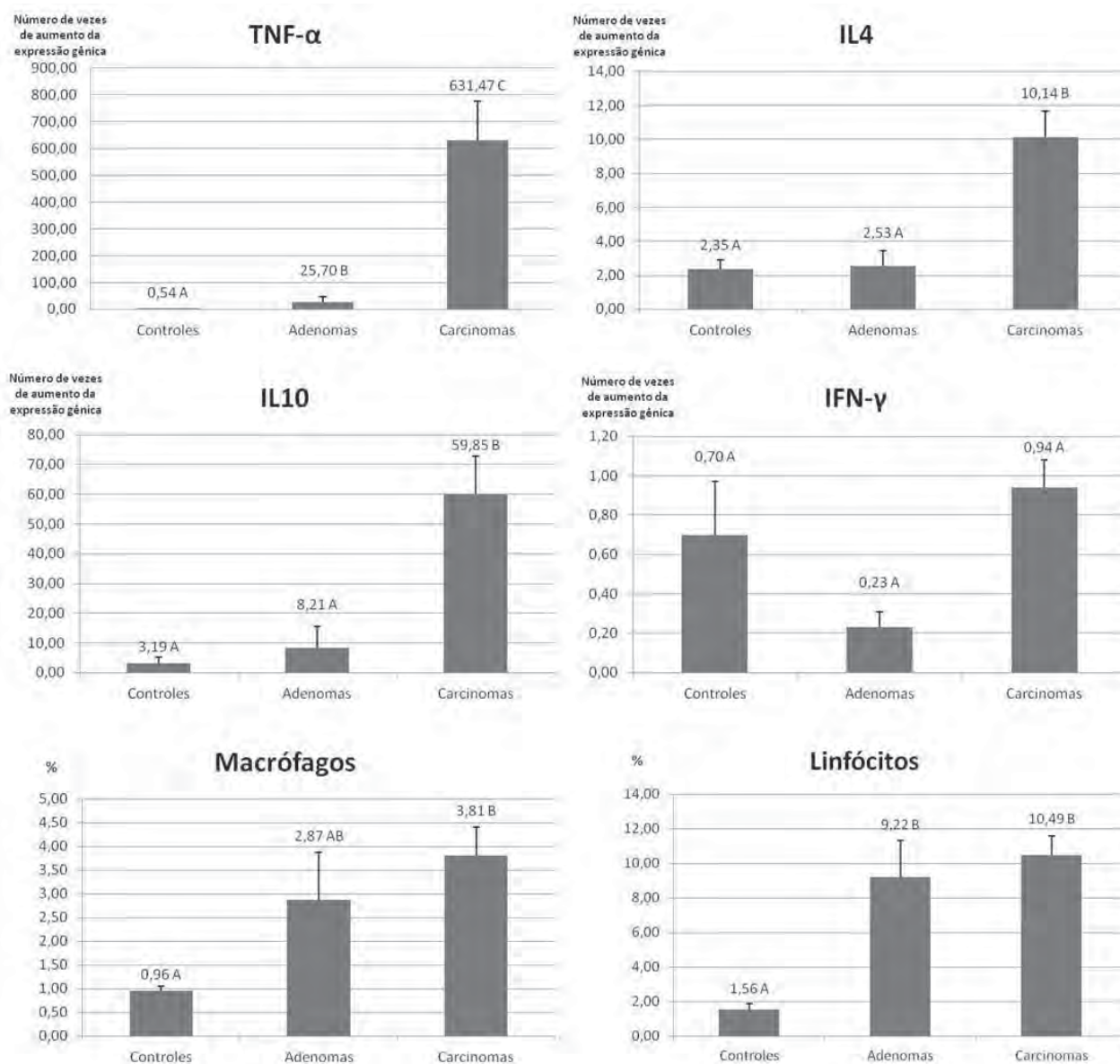


Figura 8. Médias dos grupos controle (G1), adenoma (G2) e carcinoma (G6) para as variáveis TNF- α , IL-4, IL-10, IFN- γ , macrófagos (MAC) e linfócitos T (LINF) e suas respectivas diferenças estatísticas. (letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos si pelo teste de contraste ortogonal. Nível de significância de 5%). A expressão gênica relativa foi normalizada com o gene constitutivo G3PDH.

5.3. Sistema TNM

Em relação ao sistema TMN, para o total de oito amostras avaliadas (total de oito animais) do G3, cinco tiveram TNM com escore I, duas amostras com escore II e uma com escore III. Todos os animais do grupo G3 estavam vivos até o período de censura.

Com relação ao grupo G4, foram avaliadas 11 amostras provenientes de 10 animais. Deste grupo, seis amostras obtiveram o escore I, uma escore II, três com escore III e uma com escore IV. Dos 10 animais que forneceram amostras para este grupo, um com tumor escore IV, e outro de escore III, vieram a óbito em decorrência da progressão tumoral. Um animal escore I veio a óbito, por causas não relacionadas ao carcinoma.

Para o grupo G5 foram avaliadas seis amostras de seis animais. Do grupo G5 duas amostras foram classificadas com escore I, uma com escore II e três com escore III. Dos seis animais avaliados, apenas o animal que recebeu escore II continuava vivo após o período de censura. Contudo, um dos óbitos dos animais deste grupo (amostra escore I) foi decorrente de causas não relacionadas ao tumor.

Os parâmetros avaliados de cada amostra, para a classificação no sistema TNM, bem como a listagem do número de animais vivos ou mortos encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros avaliados para a classificação TNM e a amostragem de animais vivos de acordo com cada grupo de carcinomas mamários.

Grupo Experimental ¹	Amostra	Animal ²	Tumor (T) ³	Linfonodo (N) ⁴	Metástase Distante ⁵	TNM (escore)	Vivo ⁶
G3	1	A	T2a	N0	M0	II	1
	2	B	T1a	N0	M0	I	1
	3	C	T1a	N0	M0	I	1
	4	D	T1a	N0	M0	I	1
	5	E	T1a	N0	M0	I	1
	6	F	T1a	N0	M0	I	1
	7	G	T2a	N0	M0	II	1
	8	H	T3a	N0	M0	III	1
G4	1	I	T2a	N0	M0	II	1
	2	J	T1a	N0	M0	I	0 ^A
	3	K	T2a	N1a	M1	IV	0
	4	L	T1a	N0	M0	I	1
	5	M	T1a	N0	M0	I	1
	6	N	T1a	N0	M0	I	1
	7	O	T1a	N0	M0	I	1
	8	P	T2a	N0	M0	I	1
	9	Q	T3a	N1a	M0	III	0
	10	Q	T3a	N1a	M0	III	0
	11	R	T3a	N0	M0	III	1
G5	1	S	T1a	N0	M0	I	0 ^B
	2	T	T2a	N0	M0	II	1
	3	U	T3a	N0	M1	IV	0
	4	V	T1a	N0	M0	I	0
	5	W	T2a	N1a	M1	IV	0
	6	X	T3a	N1a	M1	IV	0

1) G3: Carcinomas Papilares; G4: Carcinomas Tubulares; G5: Carcinomas Sólidos. **2)** Mesma letra indica o mesmo animal. **3)** T1a: T < 3 cm; T2a: 3 > T < 5 cm; T3a: T > 5 cm. **4)** N0=Sem evidência de metástase; N1a=Linfonodo ipsilateral envolvido, porém, não aderido. **5)** M0=Sem evidência de metástase distante; M1=Metástase à distância detectada. **6)** 0=óbito e 1=animal vivo **A)** Óbito devido a politraumatismo decorrente de atropelamento. **B)** Óbito devido insuficiência respiratória decorrente de edema pulmonar agudo.

5.4. Análise do Coeficiente de Correlação de Spearman

Na análise do coeficiente de correlação de Spearman para a expressão de RNAm de TNF- α foi observada correlação positiva forte com a AC ($\rho=0,67$) e correlação positiva média com a expressão de RNAm de IL-10 ($\rho=0,41$) e de IL-4 ($\rho=0,57$), Tabela 11. A expressão de RNAm de IL-4 correlaciona-se média e positivamente com a AC ($\rho=0,42$), forte e positivamente com a expressão de RNAm de INF- γ ($\rho=0,83$) e novamente, média e positivamente com a expressão de RNAm de IL-10 ($\rho=0,46$), Tabela 11.

A expressão de RNAm de IL-10 demonstrou, ainda, correlação positiva forte com a densidade de linfócitos T ($\rho=0,65$), Tabela 11. A expressão de RNAm de INF- γ apenas apresentou correlação, sendo esta positiva e média, com AC ($\rho=0,41$), Tabela 11.

O TE apresentou correlação, negativa e média, com o sistema TNM ($\rho=-0,42$), Tabela 11. O sistema TNM demonstrou também demonstrou uma correlação negativa e média com a sobrevivência dos animais ($\rho=0,47$), Tabela 11. A densidade de macrófagos demonstrou correlação positiva média com a densidade de linfócitos T ($\rho=0,49$), Tabela 11.

Tabela 11. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para dados em tecidos mamários caninos não neoplásicos (G1), apresentando neoplasia benigna (G2) ou carcinoma mamário (G6).

IL-4	0,57								
IL-10	0,41	0,46							
INF- γ	*	0,83	*						
TE	*	*	*	*					
AC	0,67	0,42	*	0,41	*				
TNM	*	*	*	*	-0,42	*			
VIVO	*	*	*	*	*	*	-0,47		
MAC	*	*	*	*	*	*	*	*	
LINF T	*	*	0,65	*	*	*	*	*	0,49
	TNF- α	IL-4	IL-10	INF- γ	TE	AC	TNM	VIVO	MAC

TE: tempo de evolução; AC: alteração de crescimento; TNM: sistema TNM (tumor-linfonodo-metástase); MAC: macrófagos; LINF T: linfócitos T. Os coeficientes apresentados correspondem a $p < 0,05$. Os coeficientes entre 0,65 a 1,00 apresentam correlação forte; entre 0,30 a 0,65 apresentam correlação média; entre 0,00 a 0,30 correlação fraca. Correlações positivas são diretamente correlatas e correlações negativas são inversamente correlatas.

6. DISCUSSÃO

O conhecimento a respeito da patologia do desenvolvimento tumoral e da imunologia contra os tumores é importante para a compreensão dos aspectos quanto ao desenvolvimento das neoplasias. Em cães ainda existem poucos relatos sobre este aspecto, porém no presente estudo foi possível observar a participação das citocinas e das células inflamatórias no processo de malignização dos tumores mamários.

Os dados deste trabalho demonstraram uma maior expressão de RNAm para o TNF- α nos carcinomas mamários. Estudos vêm demonstrando a presença do TNF- α em maiores quantidades, no soro ou em tecidos, em pacientes humanos com diferentes carcinomas, incluindo os carcinomas de glândula mamária, ao longo das últimas três décadas (DUNCOMBE et al., 1989; NAYLOR et al., 1993; MONTESANO et al., 2005; SETHI et al., 2011; BRAILO et al., 2012).

Contudo não foram encontrados estudos na veterinária sobre as ações do TNF- α nos tumores de glândula mamária canina. A literatura encontrada até este momento traz apenas referências a respeito dos efeitos terapêuticos do TNF- α humano recombinante sobre as neoplasias mamárias caninas *in vitro* (AOKI et al., 1998) e *in vivo* (THAMM et al., 2010).

Embora as diferenças da expressão do TNF- α entre os carcinomas papilar, tubular e sólido pareçam, por hora, não ter uma explicação aparente, sabe-se que o perfil de citocinas no microambiente tumoral é regido, por um lado, pela cinética dos leucócitos infiltrantes no tumor, durante o processo de tumorigênese, além de mudanças específicas na ativação dos fatores de transcrição gênica como Gata-3 e os STATs (REOME et al., 2004; SMOLKOVA et al., 2011; SETHI et al., 2012, VILLALBA et al., 2013). Por outro lado, sabe-se que a secreção de TNF- α no ambiente tumoral, pode ser independente da presença de MACs ou TIL_T, pois várias outras células constituintes do MaT podem secretar esta citocina, como, por exemplo as células epiteliais, neoplásicas ou normais (AGGARWAL et al., 2006; COUSSENS; POLLARD, 2009).

Logo, a literatura vem elucidando que a influência dos fatores de transcrição gênica e a secreção do TNF- α pelas células tumorais parecem ser os fatores que expliquem estes resultados entre os diferentes tipos de carcinomas mamários canino.

Quanto à correlação do TNF- α com as AC, seja por um aceleração do crescimento tumoral notado pelos proprietários, e/ou ulceração, é explicado por sua ação paradoxal em todas as fases de evolução do tumor, como citado anteriormente. Mudanças na MEC são necessárias para a expansão e invasão tumoral e esta citocina apresenta papel crucial nestas alterações. O TNF- α pode atuar como um sinalizador, que através do NF κ B, induz a expressão gênica de fatores pró-invasivos como o indutor da metaloproteinase da MEC, que irá ativar a metaloproteinase-9 (MMP-9), responsável pela degradação da MEC local (COUSSENS; POLLARD, 2009).

Apesar dos MACs serem grandes secretores desta citocina, não houve uma correlação entre estas células ou TIL_{Ts} e a expressão do TNF- α , corroborando com os estudos de Coussens e Pollard (2009), que demonstraram que a secreção do TNF- α no ambiente tumoral, pode ser independente da presença das células inflamatórias infiltrantes no tumor, pois as outras células epiteliais constituintes do MaT podem secretar esta citocina.

É possível que haja alguma interação biológica, indireta, entre o TNF- α e os MACs, uma vez que há uma interação positiva entre o TNF- α e as citocinas IL-4 e IL-10, que são capazes de ativar os MACs para os polarizarem em M2, que, além de não secretarem TNF- α , estão relacionados à promoção da angiogênese e ao remodelamento da MEC, auxiliando o processo de invasão celular pelas células neoplásicas. Enquanto o subtipo M1, que secreta TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, estão relacionadas com a regressão do tumor (GORDON, 2003; MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; SCHWERTFEGER; ROSEN; COHEN, 2006). Logo, a falta de correlação entre MACs e TNF- α poderia ser explicada pela ausência de M1 e preponderância de M2 no sítio tumoral.

O fato da expressão da IL-4 ser maior para o grupo G6 comparativamente aos grupos G1 e G2, demonstra um perfil de citocinas Th2, que pode estar sendo predominante nestes carcinomas. É encontrado na literatura que o desequilíbrio da relação Th1/Th2, com predominância de citocinas Th2, são fundamentais para os

mecanismos de evasão tumoral, sendo a IL-4 a principal citocina sinalizadora para uma resposta Th2 (REED, 1995; SATYAM et al., 2009). As células epiteliais neoplásicas também são capazes de secretar IL-4 (ZHANG et al., 2008), sugerindo efeitos parácrinos em outras células, para que se aumente a secreção do perfil de citocinas Th2, independente dos TIL_Ts, uma vez que não houve correlação positiva entre esta citocina e estes leucócitos.

Os carcinomas papilares foram os únicos que não apresentaram diferença significativa com os grupos G1 e G2 para a expressão de IL-4, talvez isso seja parte de uma explicação do porquê este subtipo histopatológico não seja o mais agressivo dos carcinomas. Porém, não foram encontrados dados na literatura atual que expliquem as diferenças da expressão desta citocina entre os subtipos dos carcinomas.

A IL-10, assim como a IL-4, não apresentou diferença significativa entre G1 e G2, mas houve diferença significativa da IL-10 dos grupos G1 e G2 com G6. Estes dados demonstram que o aumento da expressão de IL-4 e IL-10, citocinas de perfil Th2, está associado à malignidade tumoral, corroborando com os estudos de Reome, et al. (2004) e Satyam, et al. (2009). Como discutido anteriormente, estas duas citocinas estão relacionadas à ativação e manutenção de M2 no sítio tumoral, auxiliando a progressão do tumor.

A correlação entre TIL_Ts e o IL-10 sugerem que mesmo que os TIL_Ts sejam persistentes em carcinomas, eles parecem não exercer seus papéis na defesa antitumoral, não estando responsivos às células neoplásicas (REOME et al., 2004). Tal fato parece ocorrer mediante a presença de citocinas imunossupressoras (MIZOGUCHI et al., 1997), onde pode-se incluir a IL-10, e, a provável presença das células T regulatórias, as quais, sob influência da IL-10 suprimem a resposta imune do hospedeiro ao inibir a atividade de outras células T helper, CTLs e células NK (DEETHS; KEDL; MESCHER, 1999; BILLER et al., 2007; O'NEILL et al., 2009; KIM et al., 2012). Esta anergia dos linfócitos T também pode estar relacionada à deficiência das moléculas de MHC I no MaT, induzido pela IL-10, facilitando a progressão tumoral (MATSUDA et al., 1994).

Quanto ao INF- γ , esta citocina não apresentou diferença significativa entre qualquer um dos grupos experimentais. De fato, ela tende a estar suprimida durante o

desenvolvimento tumoral, pois é a principal citocina de ativação do perfil Th1, importante para a ação antitumoral (REOME et al., 2004). Porém, uma teoria discutida por Zaidi e Marliño (2011) é que o $\text{INF-}\gamma$ também atua como um fator pró-tumoral, pois ele mantém as células com potencial oncogênico em um estado de aparente equilíbrio com o sistema imune e é possível que esta seja mais uma resposta para a expressão de $\text{INF-}\gamma$ ser tão semelhante entre carcinomas, adenomas e tecidos mamários normais e ter correlação positiva com a presença de AC.

Outro aspecto relevante é que o $\text{INF-}\gamma$ pode ativar o STAT-1 em uma atividade biológica pró-tumoral, sendo um mecanismo de evasão tumoral que parece estar relacionado com uma fase de cronicidade do desenvolvimento neoplásico (PEROU et al., 1999; HIX et al., 2013).

Tanto os MACs, quanto os $\text{TIL}_{\text{T}}\text{s}$, apresentaram diferença significativa entre G6 e G1, correspondendo com os dados da literatura, que referem a presença destes leucócitos infiltrantes no tumor com características de malignidade e um prognóstico pobre (SCHWERTFEGER; ROSEN; COHEN, 2006; COUSSENS; POLLARD, 2011). Os MACs e os $\text{TIL}_{\text{T}}\text{s}$ também não apresentaram diferença significativa do G2 com G3, G4 e G5, podendo isto, corresponder a uma ação de progressão entre neoplasias benignas e malignas no que se refere à diferenciação das células epiteliais, pois, segundo Coussens e Pollard (2011), os mesmos mecanismos envolvidos na diferenciação epitelial durante a embriologia normal da glândula mamária estão também relacionados com a tumorigênese. Os dados também mostraram que estes leucócitos apresentam uma correlação positiva entre si, indicando que a inflamação no MaT permite o desenvolvimento tumoral (COUSSENS; POLLARD, 2011).

A correlação negativa entre o TE e o sistema TNM, demonstrou que quanto maior o tempo de evolução, menor é o escore TNM. O sistema TNM por sua vez, apresentou correlação negativa com o fato dos animais estarem vivos, demonstrando que, quanto maior o score TNM, menor o número de animais vivos. Embora não tenham sido encontrados estudos na literatura que expliquem uma interação entre o tempo de evolução e os sistemas de gradações clínicos existentes, pode-se sugerir que tumores com tempos de evolução prolongados parecem ser menos agressivos, ou seja, apresentam um escore TNM baixo, o que é correlacionado com o maior tempo de sobrevivência dos animais.

Este estudo demonstrou que todas as citocinas e os leucócitos infiltrantes estudados, nos carcinomas, estão compondo o MaT da terceira fase do desenvolvimento tumoral denominada fase de escape, como proposto por Schreiber et al. (2011), vindo a possibilitar o desenvolvimento do tumor.

Houve aumento de todas as citocinas, excetuando-se o $\text{INF-}\gamma$, e dos leucócitos infiltrantes nos carcinomas, em relação ao grupo controle. Porém, como discutido anteriormente, o $\text{INF-}\gamma$, parece exercer o seu papel pró-tumoral mesmo não estando superexpresso no MaT. Isto corrobora com as afirmações de que os tumores são capazes de controlar e subverter a resposta imunológica no microambiente tumoral, ver Figura 9 (COSTA, 2010; SMOLKOVA et al., 2011; VILLALBA et al., 2013).

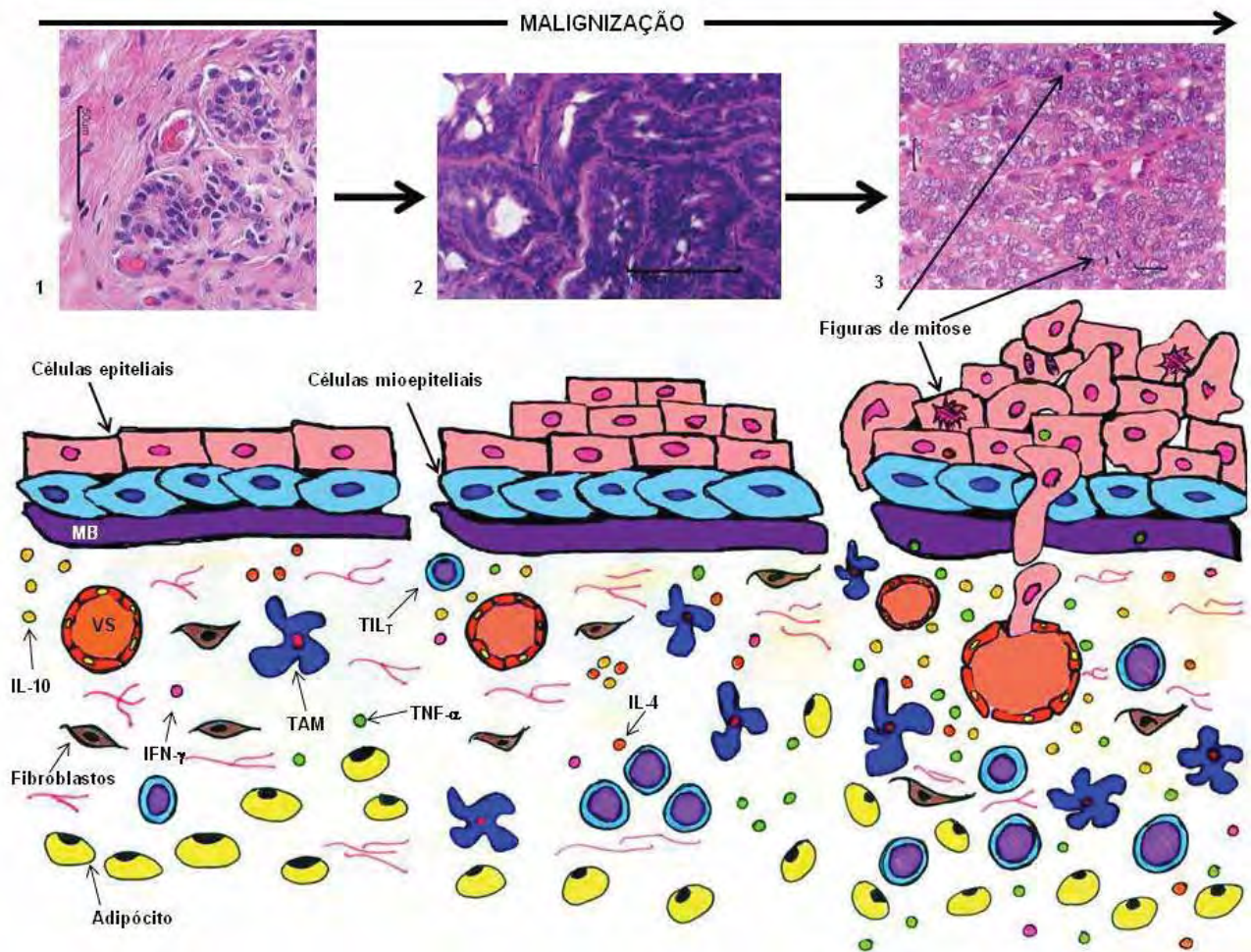


Figura 9: **1.** Citocinas e células inflamatórias compõem o microambiente da glândula mamária normal. **2.** Os mesmos componentes presentes no microambiente tecidual mamário agora compõem o microambiente tumoral (MaT), auxiliando no desenvolvimento de uma neoplasia benigna na glândula mamária. **3.** O processo de malignização das células epiteliais normais culmina com o desenvolvimento de carcinomas na glândula mamária. Há perda da arquitetura tecidual normal, com rompimento da membrana basal (MB) e a presença de figuras de mitose podem ser frequentes. As células neoplásicas podem alcançar os vasos sanguíneos (VS) permitindo a metastatização do carcinoma. Há uma mudança acentuada deste MaT quando comparado com o microambiente da glândula mamária normal, havendo aumento na expressão de citocinas como o TNF- α , IL-4 e IL-10, além do número de linfócitos T infiltrantes no tumor (TIL-T) e macrófagos associados ao tumor (TAM). Estas citocinas podem ser produzidas por qualquer componente celular do tecido mamário, desde adipócitos às próprias células epiteliais malignas.

7. CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que:

1. As maiores expressões de TNF- α , IL-4 e IL-10 estão relacionadas à malignidade e à progressão dos carcinomas mamários em cadelas;
2. Diferentes subtipos de carcinomas expressam, de forma diferente, as citocinas estudadas;
3. A presença de macrófagos e linfócitos T no microambiente está relacionada à malignidade dos carcinomas mamários em cadelas;

8. REFERÊNCIAS

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

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621. 2006. Doi:10.1016/j.bcp.2006.06.029.

ANDRÉS, P.J.; ILLERA, J.C.; CÁCERES, S.; DÍEZ, L.; PÉREZ-ALENZA, M.D.; PEÑA, L. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 245–251. 2013. Acessível em > <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.12.010><.

AOKI, M.; KUWAMURA, M.; KOTANI, T.; KATAMOTO, H.; KUBO, K.; NOMURA, K.; SASAKI, N.; OHASHI, F. In vitro cytotoxicity of recombinant human-TNF-alpha and actinomycin D on canine normal and tumor cells. *J Vet Med Sci.*, v. 60, n. 10, p. 1087-1091. 1998.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 361–71. 2009.

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

BENJAMIN, S.A.; LEE, A.C., SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**. v.36, n.5, p.423-436, 1999.

BERGMAN, P. J. Cancer Immunotherapy. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 40, p. 507–518. 2010. Doi:10.1016/j.cvsm.2010.01.002.

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

BORENA, B.M.; BUSSCHE, L.; BURVENICH, C.; DUCHATEAU, L.; VAN de WALLE, G.R. Mammary Stem Cell Research in Veterinary Science: An Update. **Stem Cells and Development**, v. 0, p. 1-9. 2013. DOI: 10.1089/scd.2012.0677.

BRAILO, V.; VUCICEVIC-BORAS, V.; LUKAC, J.; DOLORES BIOCINA-LUKENDA, D.; ZILIC-ALAJBEG, I.; ALEKSANDAR MILENOVIC, A.; BALIJA, M. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n.1, p. e10-5. 2012.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P. A.; MAGALHAES, G. M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; CAMPOS, C. B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153-180, 2011.

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

COSTA, F.F. Epigenomics in cancer management. *Cancer Management and Research*, v.2, p. 255–265. 2010. Doi: 10.2147/CMR.S7280.

COX, M.M.; DOUDNA, J.A.; O'DONNELL. Estudando os genes. In: _____.1^a ed. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas*. Porto Alegre, RS, 2012. p. 226-228.

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

CRUIJSEN ,H.V; GIACCONE, G.; HOEKMAN, K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: opportunities for combined anticancer strategies. Mini-Review: **Int. J. Cancer**, v. 118, p. 883–888. 2006. DOI 10.1002/ijc.21479.

DEETHS, M.J.; KEDL, R.M.; MESCHER, M.F. CD8 T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of costimulation. **J. Immunol.**, v. 163, p. 102–110. 1999.

DICKSON, C.; CREER, A.; FANTL, V. Mammary gland oncogenes as indicators of pathways important in mammary gland development. **Oncogene**, v. 19, p. 1097-1101. 2000.

DUNCOMBE, A.S.; HESLOP, H.E.; TURNER, M.; MEAGER, A.; PRIEST, R.; EXLEY, T.; BRENNER, M.K. Tumor necrosis factor mediates autocrine growth inhibition in a chronic leukemia. **J Immunol**, v. 143, n.11, p. 3828–34. 1989.

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

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological grade. In: _____. 3th ed. **Systemic Pathology. The breast**. London: Churchill Livingstone, 1998. p. 365-384.

EISENTHAL, A.; SCHWARTZ, I.; ISSAKOV, J.; KLAUSNER, Y.; MISONZHNIK, F.; LIFSCHITZ-MERCER, B. Immunohistochemistry evaluation of the effect in vivo of tumor necrosis factor (TNF)-alpha on blood vessel density in murine fibrosarcoma. **Sarcoma**, v. 7, n. 2, p. 57-61. 2003. doi: 10.1080/13577140310001607275.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrinology Review**, v. 25, p. 581–611. 2004.

GELALETI, G.B.; JARDIM, B.V.; LEONEL, C.; MOSCHETTA, M.G.; ZUCCARI, D.A.P.C. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 146, p. 106–112. 2012.

GICANTE, M.; GESUALDO, L.; RANIERI, E. TGF-beta: a master switch in tumor immunity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 27, p. 4126-4134. Doi: 10.2174/1381612212802430378.

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. Doi: 10.1177/0300985810393258.

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

GOUON-EVANS, V.; LIN, E.Y; POLLARD, J.W. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. **Breast Cancer Research**, v. 4, n.4, p. 155-164. 2002.

GOUKASSIAN, D.A.; QIN, G.; DOLAN, C.; MURAYAMA, T.; SILVER, M.; CURRY, C.; EATON, E.; LUEDEMANN, C.; MA, H.; ASAHARA, T.; ZAK, V.; MEHTA, S.; BURG, A.; THORNE, T.; KISHORE, R.; LOSORDO, D.W. Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization. **Circulation**, v.115, p. 752–762. 2007. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.647255.

GYORKI, D.E.; ASSELIN-LABAT, M.L.; ROOIJEN, N.V.; LINDEMAN, G.J.; VISVADER, J.E. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. **Breast Cancer Research**, v. 11, n.4, p. 1-6. 2009. doi:10.1186/bcr2353.

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

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

HOUSTON, S.J.; PLUNKETT, T.A.; BARNES, D.M.; SMITH, P.; RUBENS, R.D.; MILES, D.W. Overexpression of c-erbB2 is an independent marker of resistance to endocrine therapy in advanced breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 79, p.1220–1226. 1999. Doi: 10.1038/sj.bjc.6690196.

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

INOUE, M.; SHIRAMIZU, K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc Proteins in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**. v.120, n.2, p.169-175. 1999.

KAIMALA, S.; BISANA, S.; KUMAR, S. Mammary gland stem cells: More puzzles than explanations. **J. Biosci.**, v. 37, n. 2, p. 349-358. 2012. DOI 10.1007/s12038-012-9200-z.

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

KHALED, W.T.; READ, E.K.; NICHOLSON, S.E.; BAXTER, F.O.; BRENNAN, A.J.; CAME, P.J.; SPRIGG, N.; ANDREW, N.J.; WATSON, M.; WATSON, C.J. The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. **Development**, v. 134, n. 15, p. 2739–2750. 2007. doi:10.1242/dev.003194.

KIM, J.H.; HUR, J.H.; LEE, S.M.; IM, K.S.; KIM, N.H.; SUR, J.H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222–227. 2012. Doi:10.1016/j.tvjl.2011.10.022.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A.D. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v. 10, n. 618, p. 1-11. 2010. Acessível em > <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/618><.

KNIGHT, C.H; PEAKER, M. Development of the mammary gland. **Journals of Reproduction & Fertility**, v. 65, p. 521-536. 1982.

KOUROS-MEHR, M.; SLORACH, E.M.; STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. GATA-3 Maintains the Differentiation of the Luminal Cell Fate in the Mammary Gland. **Cell**, v. 127, p. 1041–1055. 2006. DOI 10.1016/j.cell.2006.09.048.

KRÓL, M.; PAWŁOWSKI, K.M.; MAJCHRZAK, K.; GAJEWSKA, M.; MAJEWSKA, A.; MOTYL, T. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 16, p. 2-20. 2012.

KUMARAGURUPARAN, R.; KARUNAGARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MURALI

MANOAR, B.; NAGINI, S. Of humans and canines: A comparative evaluation of Heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 365, p. 168-76, 2006.

LEE, E.Y.H.P.; MULLER, W.J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. 1-18. 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a003236.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 605–631. 2005. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525.

LYNCH, R.A.; ETCHIN, J.; BATTLE, T.E.; FRANK, D.A. A small-molecule enhancer of signal transducer and activator of transcription 1 transcriptional activity accentuates the antiproliferative effects of IFN-gamma in human cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, p.1254-1261. 2007. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2439.

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

MATSUDA, M.; SALAZAR, F.; PETERSSON, M.; MASUCCI, G.; HANSSON, J.; PISA, P.; ZHANG, Q-J; MASUCCI, M.G.; KIESSLING, R.. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. **J Exp Med**, v. 180, p. 2371-2376. 1994.

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

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, E. Definitions and explanatory notes. In: _____ 1^a ed. **Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p. 18-27. 1999.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: I. Sarcomas. **Veterinary Pathology**, v. 8, p. 99–117. 1971.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumours: II. Adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 447–470. 1972.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J.F.; JABARA, A.G.; VON SANDERSLEBEN, J: Canine malignant mammary tumours: III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumours. **Veterinary Pathology**, v. 10, p. 241–256. 1973.

MIZOGUCHI, H.; O'SHEA, J.J.; LONGO, D.L.; LOEFFLER, C.M.; McVICAR, D.W.; OCHOA, A.C. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from-bearing mice. **Science**, v. 258, p. 1795-1798. 1992

MONTESANO, R.; SOULIE, P.; EBLE, J.A.; CARROZZINO, F. Tumour necrosis factor alpha confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells. **J Cell Sci**, v. 118(Pt 15) p. 3487–500. 2005. doi: 10.1242/jcs.02467.

NAYLOR, M.S.; STAMP, G.W. FOULKES, W.D.; ECCLES, D.; BALKWILL, F.R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 2194–206. 1993. Doi: 10.1172/JCI116446.

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

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C.E.; HARRIS, A.L.; MCGEE, J.O. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. **Lancet**, v. 342, n.8864, p.148–9.1993. Doi:10.1016/0140-6736(93)91348-P.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; CALVERT, E.L.; HALL, E.J.; DAY, M.J. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, p. 101–111. 2005.

PEAKER, M. The mammary gland in mammalian evolution: a brief commentary on some of the concepts. **J. Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 3, p.347–353. 2002.

PEROU, C.M.; JEFFREY, S.S.; VAN DE RIJN, M.; REES, C.A.; EISEN, M.B.; ROSS, D.T.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.F.; ZHU, S.X.; LEE, J.C.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 9212-9217. 1999.

PIXLEY, F.J.; STANLEY, E.R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. **Trends Cell Biol**, v. 14, p. 628-638. 2004. doi:10.1016/j.tcb.2004.09.016.

PORRELLO, A.; CARDELLI, P.; SPUGNINI, E.P. Pet models in cancer research: General principles. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 23, n.2, p. 181-93. 2004.

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

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

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

SASI, S.P.; YAN, X.; ENDERLING, H.; PARK, D.; GILBERT, H-Y.; CURRY, C.; COLEMAN, C.; HLATKY, L.; QIN, G.; KISHORE, R.; GOUKASSIAN, D.A. Breaking the 'harmony' of TNF- α signaling for cancer treatment. **Oncogene**, v. 31, p. 4117-4127. 2012. Doi:10.1038/onc.2011.567

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

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v. 26, p. 419-426. 1970.

SCHWERTFEGER, K.L.; ROSEN, J.M.; COHEN, D.A. Mammary gland macrophages: pleiotropic functions in mammary development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 11, p. 229-238. 2006. Doi: 10.1007/s10911-006-9028-y.

SCHREIBER, R.D.; OLD, L.J.; SMYTH, M.J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570. 2011. Doi: 10.1126/science.1203486.

SETHI, G.; SHANMUGAM, M.K.; RAMACHANDRAN, L.; KUMAR, A.P.; TERGAONKAR, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Biosci. Rep.**, v. 32, p. 1–15. 2012. Doi: 10.1042/BSR20100136.

Sica, A.; Larghi, P.; Mancino, A.; Rubino, L.; Porta, C.; Totaro, M.G.; Rimoldi, M.; Biswas, S.K., Allavena, P.; Mantovani, A. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol.**, v. 18, n.5, p.349-55. 2008. Doi: 10.1016/j.semcancer.2008.03.004.

SMITH, C.A.; FARRAH, T.; GOODWIN, R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. **Cell**, v. 76, p. 959–962. 1994.

SMOLKOVA, K.; PLECITA-HLAVATA, L.; BELLANCE, N., BENARD, G.; ROSSIGNOL, R.; JEZEK, P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 43, p. 950–68. 2011.

STANDISH, LJ; SWEET, ES; NOVACK, J; WENNER, CA; BRIDGE, C; NELSON, A; MARTZEN, M; TORKELESON, C. Breast cancer and immune system. **J. Soc. Integr. Oncol.**, v.6, n.4, p. 158-68. 2008.

STINGL, J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 229–241. 2009. Doi: 10.1002/path.2457.

SZEWCZYK G, SZUKIEWICZ D, ZACZEK R, MASLINSKA D. Mast cells in the mouse mammary gland—correlation with the development of lactiferous structures. **Folia Biol**, v. 48, p. 13-17. 2000.

TAYLOR, G.N.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C.W.; ANGUS, W.; MCFARLAND, S. Mammary neoplasia in a closed Beagle colony. **Cancer Research**, v. 36, p. 2740–2743. 1976.

THAMM, D.H.; KURZMAN, I.D.; CLARK, M.A.; EHRHART III, E.J.; KRAFT, S.L.; GUSTAFSON, D.L.; VAIL, D.M. Preclinical Investigation of PEGylated Tumor Necrosis Factor α in Dogs with Spontaneous Tumors: Phase I Evaluation. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 5, p. 1498-1508. 2010.

TÖPFER, K.; KEMPE, S.; MÜLLER, N.; SCHMITZ, M.; BACHMANN, M.; CARTELLIERI, M.; SCHACKERT, G.; TEMME, A. Tumor Evasion from T Cell Surveillance. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-19 .2001. doi:10.1155/2011/918471.

UZZAN, B.; NICOLAS, P.; CUCHERAT, M.; PERRET, G.Y. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Cancer Research**, v. 64, p. 2941–55. 2004.

VILLALBA, M.; RATHORE, M.G.; LOPEZ-ROYUELA, N.; KRZYWINSKA, E.; GARAUDE, J.; ALLENDE-VEGA, N. From tumor cell metabolism to tumor immune escape. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 106–113. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.024>.

WARBURG, O. Metabolism of Tumors. **London**: Arnold Constable; 1930.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, 124, p. 269–70. 1956.

WATSON, C.J.; OLIVER, C.H.; KHALED, W.T. Cytokine signaling in mammary gland development. **Journal of Reproductive Immunology**. V.88, p. 124-129. 2011. Doi: 10.1016/j.jri.2010.11.006.

WEISS, E.; MAMELAK, A.J.; LA MORGIA, S.; WANG, B.; FELICIANI, C.; TULLI, A.; SAUDER, D.N. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. **J Am Acad Dermatol**, v. 50, n. 5, p. 657-675. 2004. Doi:10.1016/j.jaad.2003.11.075.

WILLENBROCKA, S.; BRAUNB, O.; BAUMGART, J.; LANGE, S.; JUNGHANSS, C.; HEISTERKAMPE, A.; NOLTEA, I.; BULLERDIEKA, J.; ESCOBAR, H.M. TNF- α induced secretion of HMGB1 from non-immune canine mammary epithelial cells (MTH53A). **Cytokine**, v. 57, p. 210–220. 2012. doi:10.1016/j.cyto.2011.11.011.

WONG, G.H.; GOEDDEL, D.V. Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 1751–1755. 1994.

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

ZHANGA, W.J.; LI, B.H.; YANG, X.Z.; LI, P.D.; QIN YUAN, Q.; LIU, X.H.; XUB, S.B.; HANG, Y.; YUANB, J.; GERHARDC, G.S.; MASKER, K.K.; DONG, C.; KOLTUNE, W.A.; CHORNEY, M.J. IL-4-induced Stat6 activities affect apoptosis and gene expression in breast cancer cells. **Cytokine**, v. 42, p. 39–47. 2008. doi:10.1016/j.cyto.2008.01.016.

APÊNDICE

Apêndice A: Questionário de Avaliação do Paciente Oncológico

DATA:

Nome do Animal:

RG HV:

Idade:

Raça:

Proprietário:

Telefone:

Cidade:

Castrada: () Sim () Não

Tempo de Evolução:

Ulcerado: () Sim () Não

Metástase: () Sim () Não

Local:

Recidiva: () Sim () Não
Não

Uso prévio de contraceptivos: () Sim ()

Conformação (estado corporal):

() Magro () Normal () Sobrepeso

Ciclo estral:

- () 6/6 meses
() Menor que 6 meses
() Maior que 6 meses
() Não observado

Número de partos:

Apresentação de pseudociese:

() Não () Sim. Frequência:

Mastite clínica:

- () Não diagnosticada
() Uma vez
() Duas vezes
() Três ou mais vezes

Presença de secreção mamária:

Presença de outros tumores:

Local:



Esquerda

M1:

M2:

M3:

M4:

M5:

Linfonodo:

TAMANHO

Direita

M1:

M2:

M3:

M4:

M5:

Linfonodo: