

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

TAWANE AGDA LOPES DE MELO

**Análise da expressão de receptor de estrógeno e da
distribuição de macrófagos nos tumores mamários
caninos**

Araçatuba – SP

2019

TAWANE AGDA LOPES DE MELO

**Análise da expressão de receptor de estrógeno e da
distribuição de macrófagos nos tumores mamários
caninos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia
Médica e Cirúrgica)

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília
Rui Luvizotto

Coorientador: Prof. Dr. Heitor Flávio Ferrari

Araçatuba – SP

2019

M528a

Melo, Tawane Agda Lopes de

Análise da expressão de receptor de estrógeno e da distribuição de macrófagos nos tumores mamários caninos / Tawane Agda Lopes de Melo. -- Araçatuba, 2019

41 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Maria Cecília Rui Luvizotto

Coorientador: Heitor Flávio Ferrari

1. Carcinoma mamário canino. 2. Histopatologia. 3. Imunohistoquímica. 4. Receptor hormonal. 5. Histiócitos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

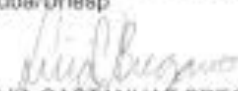
Título: Análise da expressão de receptor de estrogênio e da distribuição de macrófagos nos
tumores mamários caninos.

AUTORA: TAWANE AGDA LOPES DE MELO
ORIENTADORA: MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO
COORDENADOR: HEITOR FLÁVIO FERRARI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. HEITOR FLÁVIO FERRARI
Curso de Medicina Veterinária / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium de Araçatuba


Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Dra. LÍVIA CASTANHAS BREGANÓ
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 18 de janeiro de 2019.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tawane Agda Lopes de Melo – nascida em São Bernardo do Campo, São Paulo, em 17 de junho 1991, filha de Sebastião Alves de Melo Filho e Geniclei Aparecida Lopes de Melo. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Metodista de São Paulo – UMESP, Campus Planalto, em 2013. Em abril de 2014 iniciou sua residência no setor de Patologia Animal, com dois anos de duração, no Programa de Aprimoramento em Práticas Hospitalares Veterinárias na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) no campus de Araçatuba. Em março de 2016 ingressou no mestrado no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação da Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto com bolsa CAPES. Em 29 de Novembro de 2018 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado “Análise da expressão de receptor de estrógeno e da distribuição de macrófagos nos tumores mamários caninos”, o qual faz parte desta dissertação.

**A todos que não me deixaram
desacreditar, me ensinaram e me
apoiaram nesta fase importante de minha
vida.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto, por ter ensinado muito do que sei hoje sobre nossa profissão, me instruído durante minha formação no Aprimoramento, no Mestrado e pela amizade que levarei comigo por toda a minha vida.

Às professoras que contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional, se tornando referências profissionais e que também compuseram minha banca do exame geral de qualificação, Profa. Adjunto Gisele Fabrino Machado, Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto e Prof.Ass. Dra. Daniela Bernadete Rozzapor todas as considerações que contribuíram muito para melhorar meu trabalho.

Aos residentes e funcionários do Hospital Veterinário, principalmente do setor de Patologia Animal que contribuíram no aprendizado e formação profissional.

Aos amigos que a Faculdade me proporcionou, os quais me auxiliaram e fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses anos de Aprimoramento e Mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araçatuba, e todos que a compõem pelo acolhimento.

À minha família e amigos pelo apoio, paciência e compreensão durante todas as etapas que passei. Em especial aos meus pais Geniclei e Sebastião e meus irmãos Cauã e Danielle pelo encorajamento à busca dos meus sonhos.

À Prof^a. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto e sua orientada Izabella Pazzoto pelo auxílio e disponibilização do microscópio e espaço para minhas análises.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Os ideais que iluminaram meu caminho, e que, de tempos em tempos me dão nova coragem para enfrentar a vida com alegria são a bondade, a beleza e a verdade.”

Albert Einstein

MELO, T. A. L. **Análise da expressão de receptor de estrógeno e da distribuição de macrófagos nos tumores mamários caninos.**2019. 41f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

O tumor mamário canino (TMC) é a neoplasia que mais comumente acomete cadelas idosas não castradas. Na análise histopatológica, 41 a 53% dos TMCs são classificados como malignos. Os receptores de estrógeno α (RE α) são receptores nucleares importantes na transcrição de fatores e transdução de sinais hormonais, considerados um dos fatores prognósticos para o tumor mamário humano, participam de forma ativa na carcinogênese mamária. Durante o desenvolvimento do TMC, macrófagos teciduais compõe o microambiente tumoral, com a função de estimular a angiogênese, aumentando a possibilidade de metástases, sendo fundamental para o prognóstico de neoplasia mamária na cadela e na mulher. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a expressão e a provável correlação de RE α com a distribuição de macrófagos tumorais (TAMs) em TMCs por meio de imunohistoquímica. Foram analisados 40 tumores mamários malignos, classificados histologicamente em quatro grupos distintos e um grupo controle composto por 08 glândulas mamárias caninas sem alteração anatomopatológica e seus respectivos linfonodos regionais. Os resultados mostraram que a imunomarcagem positiva ao RE α variou de um a três casos dentre os grupos histológicos estudados, havendo nestes, menor número de metástase para linfonodo. A positividade para os TAMs mostrou associação com o tipo histológico, variando de moderada a acentuada nos carcinomas mamários de alto grau

histológico que apresentaram necrose, invasão linfática e formação tubular. Não foi identificada associação da expressão de RE α com a presença de TAMs, sugerindo estudos complementares acerca desses imunomarcadores nos TMCs.

Palavras-chave: Carcinoma mamário canino. Histopatologia. Imunohistoquímica. Receptor hormonal. Histiócitos.

MELO, T. A. L. **Analysis of estrogen receptor expression and macrophage distribution in canine mammary tumours.**2019. 41f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The canine mammary tumor (CMT) is the neoplasia that most commonly affects uncastrated elderly female dogs. On histopathological analysis, 41 to 53% of CMTs are classified as malignant. Estrogen receptors α (RE α) are important nuclear receptors for transcription factors and signal transduction of hormones, considered prognosis factor for breast cancer in human, and recognized as actively involved in breast carcinogenesis. During the development of mammary cancer in canine species, macrophages composes the tumor microenvironment, stimulating angiogenesis, facilitating the local dissemination of neoplastic cells and increasing the possibility of metastasis, being fundamental for mammary neoplasia prognosis in dogs and women. This study aimed to evaluate the expression and the probable correlation of RE α with the distribution of tumor associated macrophages (TAMs) in CMTs by immunohistochemistry. Forty CMTs were analyzed histologically in four distinct groups and a control group composed of eight canine mammary glands without alteration anatomopathological and their respective regional lymph nodes. The results showed that the RE α positive immunostaining varied from one to three cases among the histological groups studied, and there was less lymph node metastasis. The positivity for TAMs showed a positive correlation with the histological type, ranging from moderate to severe in mammary carcinomas of high histological grade that presented necrosis, lymphatic invasion and tubular formation.

No correlation was identified in RE α expression with the presence of TAMs, suggesting complementary studies about these immunomarkers in CMTs.

Keywords: Canine mammary carcinoma. Histopathology. Immunohistochemistry. Hormone receptor. Histiocytes.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
OBJETIVOS.....	16
REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO 2	21
ABSTRACT	22
RESUMO	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Análise macroscópica e microscópica	26
Análise imunohistoquímica	27
Análise das imunomarcações	27
Análise estatística	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
Análise macroscópica	28
Análise microscópica	29
Análise imunohistoquímica	29
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO A – Comitê de Ética.....	41

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A incidência de tumor mamário canino (TMC) tem aumento progressivo com a idade em cadelas não castradas, sendo aos seis anos de idade 1%; aos oito anos 6%; e aos 10 anos atinge 13% (EGENVALL et al., 2005). A idade média de ocorrência do TMC varia de 10 a 11 anos, e raramente observada em cadelas com idade inferior a quatro anos. Não existe predisposição racial, porém com mais risco de ocorrer em raças puras (QUEIROGA; LOPES, 2002). A ovariossalpingohisterectomia (OSH), quando realizada antes do primeiro estro reduz o risco de desenvolvimento do tumor mamário em 0,5%. Este risco aumenta significativamente nas fêmeas esterilizadas após o primeiro ciclo estral (8,0%) e no segundo (26%). A proteção conferida pela castração desaparece após os dois anos e meio de idade, quando nenhum efeito é obtido (FONSECA; DALECK, 2000). Em relação a sua forma de apresentação clínica, as glândulas mamárias abdominais caudais e as mamas inguinais são as mais frequentemente acometidas e 50 a 70% das cadelas que apresentam múltiplos nódulos mamários podem apresentar classificações histopatológicas diferentes (SLEECKX et al., 2011).

Sistemas de classificação histopatológica de TMC são empregados com o intuito de reconhecer padrões teciduais, e analisar o comportamento do tumor e suas prováveis consequências no organismo do animal (GOBBI, 2012). A classificação feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve e subdivide carcinomas não infiltrativos, carcinomas complexos, carcinomas simples (tubulopapilífero, sólido e anaplásico), sarcomas e tumores benignos (MISDORP et al., 1999).

Cassali et al. (2011) propuseram uma classificação histopatológica por meio de um consenso entre profissionais que atuam na oncologia

veterinária baseando-se nos critérios estabelecidos por Misdorp et al. (1999) e Goldschmidt et al. (2011).

Análises baseadas na histopatologia mostraram que 41 a 53% dos TMCs são considerados malignos, porém evidências histológicas não implicam em apresentação clínica e variações histológicas podem ocorrer no mesmo tumor (BRODEY et al., 1983). A hipótese de que um tumor maligno pode se desenvolver a partir de um benigno pré-existente foi aventada por Sonrenmo et al. (2009).

O desenvolvimento do TMC é claramente hormônio dependente (MISDORP et al., 1998). Os hormônios esteróides desempenham papel importante na etiologia dos tumores mamários. A ação de hormônios esteróides ovarianos -estrógeno, prolactina e progesterona, em níveis aumentados por períodos prolongados é carcinogênica (FONSECA; DALECK, 2000). Isso ocorre devido à atividade mitogênica desses hormônios em células mamárias, exercida após a ligação com seus respectivos receptores. O tecido glandular mamário normal possui níveis elevados de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP), porém nos carcinomas mamários sem resquício de tecido epitelial normal a imunoexpressão destes apresenta-se em quantidade diminuída (DONNAY et al., 1995).

Em cães e gatos, a progesterona exógena estimula a síntese de hormônio do crescimento na glândula mamária com proliferação lóbulo-alveolar e consequente hiperplasia de elementos mioepiteliais e secretórios, induzindo a formação de nódulos benignos em animais jovens, já a prolactina facilita a ação mitótica do estrógeno, aumentando o número de seus receptores. (SILVA et al., 2004). Em seres humanos, hiperprolactinemia pode ser um indicador de prognóstico desfavorável em tumores de mama, pois tem sido associada com a malignidade do tumor e o aparecimento precoce de metástases (VONDERHAAR, 1999).

O estrógeno participa diretamente no crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral, favorecer crescimento ductal e aumentar os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator-chave para a angiogênese (ILLERA et al., 2006). Além disso, promove a transcrição de genes proliferativos e suprime genes apoptóticos, o que permite assim a proliferação celular e consequentes mutações do DNA (BRANDÃO et al., 2018).

Animais portadores de tumores de mama que expressam RE e RP, ou somente RE, apresentam melhor prognóstico do que aqueles que expressam somente RP, visto que os RE positivos correlacionam-se com tumores bem diferenciados e RP positivos com tumores pouco diferenciados (MOHR et al., 2016). A diminuição da relação RE/RP em carcinomas mamários tem sido associada à diminuição da diferenciação celular e progressão da doença em cadelas e mulheres (SARTIN et al., 1992).

Fatores sistêmicos e locais estão relacionados com a iniciação da carcinogênese pela construção de respostas inflamatórias persistentes a uma variedade de estímulos (BALKWILL; MANTOVANI, 2012). Nos tumores mamários de cadelas, camundongos e na mulher, macrófagos têm a função de facilitar a angiogênese, remodelar a matriz extracelular e promover maior mobilidade das células tumorais. Os macrófagos ocorrem em maior número em relação aos leucócitos presentes nas neoplasias (MONTEIRO et al., 2018). Estudos demonstraram que a interação direta entre os macrófagos e as células neoplásicas favorece a formação de êmbolos tumorais, pois os histiócitos facilitam a migração e o acesso à luz vascular das células tumorais (POLLARD, 2008).

Nos carcinomas mamários na mulher (CMMs) o aumento na população de macrófagos está associado à maior vascularização, o que facilita o crescimento tumoral por remover catabólitos celulares e suprir

nutrientes e oxigênio (LEEK et al., 2000). Em camundongos, a correlação estatística, previamente descrita para os casos de CMMs, tem sido confirmada, avaliando a participação dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) e seu papel em promover a angiogênese e regular a produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (BINGLE et al., 2006).

O VEGF é uma proteína dimérica produzida por células neoplásicas, macrófagos e, às vezes, também por linfócitos, que age como um mitógeno específico em veias, artérias e vasos linfáticos, e atua como fator inibidor de apoptose, estimulando a produção da proteína antiapoptótica Bcl-2 nas células endoteliais, o que pode afetar a permeabilidade do endotélio. Para sua ação angiogênica atuar, não é necessário que ocorra a ação de aumento de permeabilidade endotelial (PLATE, 2001).

Os estudos da função dos receptores hormonais têm revelado que existe relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas, o que envolve a ação de TAMs, ocasionando recidivas locais e metástases (COSTA et al., 2002; NGUYEN et al., 2017). Contudo, ainda são escassos os estudos que associam a expressão dos TAMs à de receptores hormonais.

O objetivo do estudo foi observar e correlacionar a expressão de RE α e a distribuição de macrófagos em tumores mamários malignos caninos por meio de imunohistoquímica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Observar a expressão imunohistoquímica de RE α e a distribuição de macrófagos e a interação entre esses dois marcadores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar a expressão dos RE α nas mamas sem alterações macroscópicas e nos tumores mamários malignos.

Classificar os subtipos de neoplasias mamárias e correlacionar com a expressão dos RE α .

Analisar a participação de macrófagos no microambiente tumoral por meio de imunohistoquímica.

REFERÊNCIAS

Balkwill, F.R. & Mantovani, A. 2012. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* 22: 33-40.

Bingle L., Lewis C.E., Corke K.P., Reed M.W. & Brown N. J. 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British J. of Cancer.* 94:101-107.

Brandão Y.O., Toledo M.B., Chequin A., Cristo T.G., Sousa R.S., Ramos E.A.S. & Klassen G. 2018. DNA Methylation Status of the estrogen receptor α gene in canine mammary tumors. *Vet. Path.* 10(5):1-7.

Brodey R.S., Goldschmidt M.A. & Roszel J.R. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19:61-90.

Cassali, G. D., Lavallo, G. E., DeNardi, A. B., Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Estrela-Lima, A., Alessi, A. C., Daleck, C. R., Salgado, B. S., Fernandes, C. G., Sobral, R. A., Amorim, R. L., Gamba, C. O., Damasceno, K. A., Auler, P. A., Magalhães, 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., Souza, C. M., Leite, J. S., Soares, L. M. C., Cavalcanto, M. F., Fonteles, Z. G. C., Schuch, I. D., Paniago, J., Oliveira, T. S., Terra, E. M., Castanheira, T. L. L., Feliz, A. O. C., Carvalho, G. D., 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., Bezerril, J. E., Frehse, M. S., Almeida, E. C. P., Campos, C. 2011. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz. Jour. of Vet. Path.*, v.4, n.2, p. 153-180.

Costa, S.D., Lange, S., Klinga, K., Merckle, E., Kaufmann, M. 2002. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, v.38, p.1329-1334.

Donnay, I., Rauis, J., Devkeeschouwer, N. 1995. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *J. Am. Vet. Res.* v.56, p.1188-1194.

Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., Von Euler, H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.* v.69, p.109–127.

Fonseca, C.S., Daleck, C.R. 2000. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovário-histerectomia como terapia adjuvante. *Ciência Rural*, v.30, n.4, p.731-735.

Gobbi, H. 2012. Classificação dos tumores de mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial de Saúde de 2012. *Bras.Patol.Med. Lab.* v. 48 (6), p.463-474.

Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. 2011. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. *Vet.Patho.* v.48(1), p.117-131.

Illera, J.C., Pérez-Alenza, M.D., Nieto, A. 2006. Steroids and receptors in canine mammary cancer. *Steroids*, v.71, p.541-548.

Leek, R. D., Hunt, N.C., Landers, R. J., Lewis, C. E., Royds, J. A., Harris, A. L. 2000. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* v. 190, p. 430–436.

Misdorp, W. 1998. Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Quarterly.* v.10, p.26-33.

Misdorp, E. R., Hellman, E. 1999. Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals. s.2, v.7, n.2, Washington, DC.

Mohr, A., Ripoli, F.L., Hammer, S.C., Willenbrock, S., Hewicker-Trautwein, M., Kielbowicz, Z., Escobar, H.M., Nolte, I. 2016. Hormone Receptor expression analyses in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissue by a bead based multiplex branched DNA assay: A gene expression study in fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. PLoS ONE. 11(9).

Monteiro, L.N., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Salgado, B.S., Cassali, G.D. 2018. Tumor-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. The Vet. Journal, v.234, p.119-125.

Nguyen, F., Penã, L., Ibsch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., Belousov, A., Campone, M., Abadie, J. 2018. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. Breast Cancer Res. Treat. v.167, p.635-648.

Plate, K.H. 2001. From angiogenesis to lymphoangiogenesis. Nature Medicine, v.2, n.7, p.151-152.

Pollard, J. W. 2008. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. Journal of Leukocyte Biology. v.84, p.623–630.

Queiroga, F., Lopes, C. 2002. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. In: Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras. Anais... p.183-190.

Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R. P., Wolfe L. G. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. Am. J. Vet. Res., v.38, p.2196-2200.

Silva, A.E., Serakides, R., Cassali, G. D. 2004. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. Ciência Rural, v.34, n.2, p.625-633.

Sleeckx, N., Rooster, H., Veldhuis, K.E.J.B., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L. 2011. Canine Mammary Tumors, an Overview. Reprod. Domest. Anim. v.46, n. 6, p. 1112-3.

Sonremo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H. 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. Vet. Comp. Oncol. v.7, p.162–172.

Vonderhaar, B.K. 1999. Prolactin involvement in breast cancer. Endocrine – Related Cancer, v. 6, p.389-404.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO E DA DISTRIBUIÇÃO DE MACRÓFAGOS NOS TUMORES MAMÁRIOS CANINOS¹

Tawane Agda L. de Melo, Heitor Flávio Ferrari, Analy R. M. Ferrari,
Natalia M. Rahal, Maria Cecília Rui Luvizotto

ABSTRACT - Melo T.A.L., Ferrari H.F., Ferrari A.R.M., Rahal N.M., Luvizotto M.C.R. 2019. **[Analysis of estrogen receptor expression and macrophage distribution in canine mammary tumours.]** Análise da expressão de receptor de estrógeno e da distribuição de macrófagos nos tumores mamários caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx(xx):xxx-xxx. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Rua Clóvis Pestana 793, Dona Amélia, Araçatuba, SP, 1605-680, Brazil. E-mail: tawane_agda@hotmail.com

The canine mammary tumor (CMT) is the neoplasia that most commonly affects uncastrated elderly female dogs. On histopathological analysis, 41 to 53% of CMTs are classified as malignant. Estrogen receptors α (RE α) are important nuclear receptors for transcription factors and signal transduction of hormones, considered prognosis factor for breast cancer in human, and recognized as actively involved in breast carcinogenesis. During the development of mammary cancer in canine species, macrophages population composes the tumor microenvironment, stimulating angiogenesis, facilitating the local dissemination of neoplastic cells and increasing the possibility of metastasis, being fundamental for mammary neoplasia prognosis in women and dogs. This study aimed to evaluate the expression and the probable correlation of RE α with the distribution of tumor associated macrophages (TAMs) in CMTs by immunohistochemistry. Forty CMTs were analyzed histologically in four distinct groups and a control group composed of eight canine mammary glands without alteration anatomopathological and their respective regional lymph nodes. The results showed that the RE α positive immunostaining varied from one to three cases among the histological groups studied, and there was less lymph node metastasis. The positivity for TAMs showed a positive correlation with the histological type, ranging from moderate to severe in mammary carcinomas of high histological grade that presented necrosis, lymphatic invasion and tubular formation. No correlation was identified in

¹ Texto de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira – disponível em

RE α expression with the presence of TAMs, suggesting complementary studies about these immunomarkers in CMTs.

INDEX TERMS: Canine mammary carcinoma. Histopathology. Immunohistochemistry. Hormone receptor. Histiocytes.

RESUMO- O tumor mamário canino (TMC) é a neoplasia que mais comumente acomete cadelas idosas não castradas. Na análise histopatológica, 41 a 53% dos TMCs são classificados como malignos. Os receptores de estrógeno α (RE α) são receptores nucleares importantes na transcrição de fatores e transdução de sinais hormonais, considerados um dos fatores prognósticos para o tumor mamário humano, participam de forma ativa na carcinogênese mamária. Durante o desenvolvimento do TMC, uma população de macrófagos teciduais compõe o microambiente tumoral. Nos tumores primários os macrófagos têm a função de estimular a angiogênese, aumentando a possibilidade de metástases, sendo fundamental para o prognóstico de neoplasia mamária na mulher e na cadela. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a expressão e a provável correlação de RE α e na distribuição de macrófagos tumorais (TAMs) em TMCs por meio de imunohistoquímica. Foram analisados 40 tumores mamários malignos, classificados histologicamente em quatro grupos distintos e um grupo controle composto por 08 glândulas mamárias caninas sem alteração anatomopatológica e seus respectivos linfonodos regionais. Os resultados mostraram que a imunomarcagem positiva ao RE α variou de um a três casos dentre os grupos histológicos estudados, havendo nestes, menor número de metástase para linfonodo. A positividade para os TAMs mostrou correlação positiva com o tipo histológico, variando de moderada a acentuada nos carcinomas mamários de alto grau histológico que apresentaram necrose, invasão linfática e formação tubular. Não foi identificada correlação na expressão de RE α com a presença de TAMs, sugerindo estudos complementares acerca desses imunomarcadores em TMCs.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Carcinoma mamário canino. Histopatologia. Imunohistoquímica. Receptor hormonal. Histiócitos.

INTRODUÇÃO

A incidência de tumor mamário canino (TMC) tem aumento progressivo com a idade em cadelas não castradas. A idade média de ocorrência do TMC varia de 10 a 11 anos, e raramente observada em cadelas com idade inferior a quatro anos. Não existe predisposição racial, porém com mais risco de ocorrer em raças puras (QUEIROGA; LOPES, 2002). Em relação a sua forma de apresentação clínica na cadela, as glândulas mamárias abdominais caudais e as mamas inguinais são as mais frequentemente acometidas e 50 a 70% das cadelas que apresentam múltiplos nódulos mamários podem apresentar classificações histopatológicas diferentes (SLEECKX et al., 2011).

Sistemas de classificação histopatológica de TMC são empregados com o intuito de reconhecer padrões teciduais, e analisar o comportamento do tumor e suas prováveis consequências no organismo do animal (GOBBI, 2012). Cassali et al. (2011) propuseram uma classificação histopatológica por meio de um consenso entre profissionais que atuam na oncologia veterinária baseando-se nos critérios estabelecidos por Misdorp et al. (1999) e Goldschmidt et al. (2011).

Análises baseadas na histopatologia mostraram que 41 a 53% dos TMCs são considerados malignos, porém evidências histológicas de malignidade não implicam em apresentação clínica e variações histológicas podem ocorrer no mesmo tumor (BRODEY et al., 1983). A hipótese de que um tumor maligno pode se desenvolver a partir de um benigno pré-existente foi aventada por Sonrenmo et al. (2009).

O desenvolvimento do TMC é claramente hormônio dependente (MISDORP et al., 1998). Os hormônios esteróides desempenham papel importante na etiologia dos tumores mamários. A ação de hormônios esteróides ovarianos ocorre devido à sua atividade mitogênica em células mamárias exercida após a ligação com seus respectivos receptores. O tecido glandular mamário normal possui níveis elevados de receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP), porém nos carcinomas mamários sem resquício de tecido epitelial normal a imunoexpressão destes apresenta-se em quantidade diminuída (DONNAY et al., 1995).

Animais portadores de tumores de mama, que expressam RE e RP, ou somente RE, apresentam melhor prognóstico do que aqueles que expressam somente RP, visto que os RE positivos correlacionam-se com tumores bem diferenciados (MOHR et al., 2016). A diminuição da relação RE/RP em carcinomas mamários tem sido associada à diminuição da diferenciação celular e progressão da doença (SARTIN et al., 1992).

Fatores sistêmicos e locais estão relacionados com a iniciação da carcinogênese pela construção de respostas inflamatórias persistentes a uma variedade de estímulos (BALKWILL; MANTOVANI, 2012). Nos tumores mamários de cadelas, camundongos e na mulher, macrófagos têm a função de facilitar a angiogênese, remodelar a matriz extracelular e promover maior mobilidade das células tumorais. Os macrófagos ocorrem em maior número em relação aos leucócitos presentes nas neoplasias (MONTEIRO et al., 2018).

Nos carcinomas mamários na mulher (CMMs) o aumento na população de macrófagos está associado à maior vascularização, o que facilita o crescimento tumoral por remover catabólitos celulares e suprir nutrientes e oxigênio (LEEK et al., 2000). Em camundongos, a correlação estatística, previamente descrita para os casos de CMMs, tem sido confirmada, avaliando a participação dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) e seu papel em promover a angiogênese e regular a produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (BINGLE et al., 2006).

Os estudos da função dos receptores hormonais têm revelado que existe relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas, o que envolve a ação de TAMs, ocasionando recidivas locais e metástases (COSTA et al., 2002; NGUYEN et al., 2017). Contudo, ainda são escassos os estudos que correlacionam a expressão dos TAMs à de receptores hormonais.

O objetivo do estudo foi observar e correlacionar a expressão de REα e a distribuição de macrófagos em tumores mamários malignos caninos por meio de imunohistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNESP, Campus de Araçatuba, registrado sob número de protocolo CEUA FOA-00721/2016.

Análise macroscópica e microscópica

As amostras dos TMC das cadelas submetidas à mastectomia unilateral ou bilateral, segundo indicação cirúrgica, acompanhada dos linfonodos satélites foram submetidas a exame macroscópico onde era realizada identificação, foto documentação, localização do (s) tumor (es), mensuração, existência de úlcera, superfície de corte e áreas de necrose. As amostras foram distribuídas em quatro grupos experimentais (GE) com 10 espécimes de cada e seus respectivos linfonodos: GE1- carcinoma em tumor misto; GE2 – carcinoma

tubulopapilífero; GE3 – carcinoma sólido e GE4 – carcinoma complexo, provenientes do Serviço de Patologia Veterinária da FMVA-UNESP. O grupo controle (GC) foi formado por 08 mamas e linfonodos de cadelas adultas sem alterações macroscópicas e que apresentavam ectasia e displasia na microscopia. O processamento histológico de rotina dos cortes corados pelo HE (Luna, 1968) foi seguido da análise microscópica (Olympus DX51, Olympus, Tóquio) por dois patologistas. A classificação morfológica e graduação das neoplasias mamárias seguiu os critérios estabelecidos por Cassali et al.(2011) e Goldschmidt et al. (2011), associado ou não ao comprometimento de linfonodos regionais e graduados segundo Peña et al. (2013).

Análise imunohistoquímica

Secções de blocos parafinizados dos tumores e de seus respectivos linfonodos foram submetidas à reação de imunohistoquímica para identificar macrófagos utilizando anticorpo monoclonal anti-S100A9 + Calprotectin - S100A8/A9 complex, produzido em camundongo (Clone MAC387, Abcam) na diluição 1:200. Para a recuperação antigênica os espécimes foram tratados pelo calor em micro-ondas com tampão citrato de sódio (Ácido Cítrico Monohidratado, P.A 2,1 g), 10 mm, pH 6,0 por cinco minutos. Para as etapas seguintes foi utilizado o kit com polímero (Reveal, SPB-125, Spring), segundo as recomendações do fabricante. Como controle positivo para macrófagos foi utilizado corte histológico de pulmão canino com pneumonia crônica. Na reação de imunohistoquímica para revelar receptores de estrógeno α foi utilizado o anticorpo monoclonal produzido em camundongo (anti-humano, clone 1D5) na diluição 1:2. A recuperação antigênica foi realizada com tampão Tris EDTA Tween 20 pH 8,0, em panela a vapor por 30 minutos a 95°C. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 8% por 30 minutos e imersão em leite em pó desnatado por 50 minutos para bloqueio das ligações inespecíficas. Na sequência foi usado kit comercial de revelação (polímero reveal - SPB-125, Spring), conforme recomendações do fabricante. Secções de ovário foram utilizadas como controle positivo. Ambos os anticorpos primários das imunomarcações foram incubados “over night” em câmara úmida, à 4°C e a revelação foi feita com 3,3' - Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) e contra coloração com hematoxilina de Harris.

Análise das imunomarcações

A análise da imunomarcação de TAMs e de células expressando RE α foi realizada no microscópio de luz identificando as áreas com maior imunomarcação. Para cada caso, foram examinados três campos

com objetiva de 40x para a contagem das células positivas. Para os TAMs foi padronizado e aplicado o escore médio das células imunomarcadas, ou seja, ausente, discreta (1 a 10 células), moderada (11 a 20 células) ou acentuada (>20 células). Para o anticorpo RE α a reação foi classificada como negativa (RE α -) ou positiva (RE α +).

Análise estatística

Foi realizado o teste Exato de Fisher para verificar relação entre a presença e ausência de macrófagos e receptores de estrógeno α dentro de cada grupo. Para comparar os grupos quanto à intensidade de expressão de macrófagos e receptores de estrógeno utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas no software Graphpad Prism, com intervalo de confiança estabelecido em 95% e p.valor < 0,05%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise macroscópica

A análise macroscópica baseada nos fatores tumorais e idade das cadelas dos grupos experimentais estão representadas no Quadro 1, onde a média de idade das cadelas acometidas com tumor de mama foi de 9 anos e 7 meses, de acordo com Sleeckx et al. (2011) que correlaciona o envelhecimento dos cães com o aumento do risco de tumores mamários, sendo a maioria diagnosticada por volta dos 8 aos 10 anos. Em relação à localização, dos 40 tumores mamários caninos, 47,5% (n=19) acometeram as mamas abdominais, 37,5% (n=15) mamas inguinais e 15% (n=6) mamas torácicas. Esse resultado se assemelha ao de Lana et al. (2007) que observaram a ocorrência de 65% a 75% de tumores nas glândulas mamárias abdominais e inguinais, provavelmente, por terem mais volume de tecido glandular que as demais. Quanto ao tamanho do tumor, foram mais frequentes as neoplasias que mediram de 3 a 5 cm de diâmetro, correspondendo a 45% (n=18). No que se refere à ulceração e necrose, em 12,5% (n=5) dos casos havia ulceração cutânea em consequência da infiltração tumoral e, em 52,5% (n=21) necrose na macroscopia. Esses fatores são considerados prognósticos para carcinomas mamários na cadela, onde o tamanho (> 20 mm), necrose e grau histológico III são os mais relevantes, destacando a similaridade biológica no cão e no homem (NGUYEN et al., 2018).

Análise microscópica

A classificação histopatológica do GC e dos GEs, seguiu os preceitos classificatórios adotados por Cassali et al.(2011) para tumores mamários caninos (fig. 1. A, B, C e D).

As metástases para linfonodos regionais ocorreram com maior frequência nos tumores que apresentaram grau II e III (Quadro 2), totalizando 17 casos distribuídos nos grupos de tumores analisados. De um total de 23 linfonodos sem metástases, houve maior frequência de tumores classificados com grau II, independente de sua classificação morfológica, se assemelhando ao que Rasotto et al. (2012) concluem, onde tumores de grau II e III apresentam mais metástases pois tem correlação com a agressividade observada em carcinomas de maiores graus.

Análise imunohistoquímica

Este estudo mostrou imunoreatividade ao RE α no epitélio ductal de mamas do GC, tendo sido observado, independente da classificação do tumor, no GE1 e GE3 em dois e três casos positivos, respectivamente (fig. 2. A e B) e, no GE2 e GE4 em somente uma amostra o que sugere o processo de iniciação nas células epiteliais mamárias (Quadro 3). No GC a reação foi positiva no epitélio dos ductos mamários. Resultados semelhantes são referidos por Mohr et al. (2016); Brandão et al. (2018) e Nguyen et al. (2018), afirmando a menor intensidade da imunoreatividade ao RE α em neoplasias malignas, comparadas a tecidos não neoplásicos e tumores benignos mamários. Para a intensidade aos RE α não houve diferença estatística significativa entre grupos segundo teste de Kruskal-Wallis.

Foi possível identificar que nas neoplasias onde a expressão de RE α foi positiva houve menor número de metástases para linfonodos regionais, mesmo na vigência de graduação histológica intermediária a alta (GE1 e GE3). Aydogan et al. (2018) aplicaram método semi quantitativo de análise para testes de imunohistoquímica de RE α , não tendo sido verificada diferença significativa nos TMCs classificados em tubulopapilífero, carcinoma complexo e carcinossarcoma.

As imunomarcações positivas para os macrófagos apresentaram correlação com o tipo histológico, sendo moderada a acentuada nos carcinomas mamários com altos graus histológicos (Quadro 4), os que apresentaram necrose, invasão linfática e formação tubular, assim como descreve Krol et al. (2011) e Seung et al. (2018), onde concluíram que o aumento no número de TAM estava relacionado com a habilidade de metástase em tumor mamário canino, especificamente o adenocarcinoma.

No GE1, em particular nas áreas de metaplasia cartilaginosa e/ou óssea a imunomarcacão de macrófagos somente foi identificada junto ao componente epitelial, no estroma da região periductal e periacinar, ocorrendo de modo difuso e discreto, sendo detectados em três amostras (fig. 3.A). Ao avaliar os grupos com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, foi observado que o GC e o GE1 diferem dos GE2, GE3 e GE4, cuja graduação histológica foi II em 70% dos casos e III em 27,5% dos casos nos quais foram observadas áreas com moderado a acentuado infiltrado de macrófagos entre as células neoplásicas e/ou no tecido ao redor da neoplasia de forma difusa ou até mesmo focal (figura 3.B, C e D). A quantidade de TAMs acentuada está associada às características de malignidade, como Pierini et al. (2017) afirmam, portanto apresenta prognóstico reservado. Além disso, a correlação de TAMs com RE α neste trabalho demonstrou que os TAMs constituem fator prognóstico independente da imunomarcacão positiva de RE α , concordando com Seung et al. (2018).

CONCLUSÃO

Este estudo revelou que carcinomas mamários caninos tendem a acometer animais com a idade inferior a 10 anos, sem diversidade na expressão de RE α nas diferentes classificações histológicas, bem como não apresentam correlação de RE α com a presença de TAMs. A imunoexpressão de TAMs possui relação com o grau histológico do tumor, considerado prognóstico para carcinomas na espécie canina. Estudos complementares devem ser feitos a fim de esclarecer a reatividade de RE α correlacionados com TAMs, associando dois fatores prognósticos de tumores mamários caninos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- Aydogan, A., Ozmen, O., Haligur, M., Sipahi, C., Ileri, D., Haligur, A. 2018. Immunohistochemical evaluation of bcl-2, ER-alpha, caspase -3, -8, -9, PCNA and Ki-67 expressions in canine mammary carcinomas. *Biotechnic&Histochemistry*. 93:4, 286-292.
- Balkwill, F.R. & Mantovani, A. 2012. Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin. Cancer Biol.* 22: 33-40.
- Bingle L., Lewis C.E., Corke K.P., Reed M.W. & Brown N. J. 2006. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British J. of Cancer*. 94:101-107.
- Brodey R.S., Goldschmidt M.A. & Roszel J.R. 1983. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19:61-90.
- Cassali, G. D., Lavallo, G. E., DeNardi, A. B., Ferreira, E., Bertagnolli, A. C., Estrela-Lima, A., Alessi, A. C., Daleck, C. R., Salgado, B. S., Fernandes, C. G., Sobral, R. A., Amorim, R. L., Gamba, C. O., Damasceno, K. A., Auler, P. A., Magalhães, 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., Souza, C. M., Leite, J. S., Soares, L. M. C., Cavalcanto, M. F., Fonteles, Z. G. C., Schuch, I. D., Paniago, J., Oliveira, T. S., Terra, E. M., Castanheira, T. L. L., Feliz, A. O. C., Carvalho, G. D., 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., Bezerril, J. E., Frehse, M. S., Almeida, E. C. P., Campos, C. 2011. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz. Jour. of Vet. Path.*, v.4, n.2, p. 153-180.
- Costa, S.D., Lange, S., Klinga, K., Merckle, E., Kaufmann, M. 2002. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, v.38, p.1329-1334.
- Donnay, I., Rautis, J., Devkeeschouwer, N. 1995. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *J. Am. Vet. Res.* v.56, p.1188-1194.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., Von Euler, H. 2005. Incidence of and survival after mammary tumors in a

population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev. Vet. Med.* v.69, p.109–127.

Gobbi, H. 2012. Classificação dos tumores de mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial de Saúde de 2012. *Bras.Patol.Med. Lab.* v. 48 (6), p.463-474.

Goldschmidt, M., Peña, L., Rasotto, R., Zappulli, V. 2011. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors *Vet. Pathol.* v.48(1), p.117-131.

Gwak, M.J., Jang, M.H., Kim, D., Seo, A.N., Park, S.Y. 2015. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS ONE* v.10(4).

Leek, R. D., Hunt, N.C., Landers, R. J., Lewis, C. E., Royds, J. A., Harris, A. L. 2000. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.* v. 190, p. 430–436.

Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J. 2007. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M., Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier. p.619-636.

Luna, L. G. 1968. Rotine Staining Procedures. In: Luna, L. G. (eds) *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGrae-Hill Book Co. Cap. 4, p.32-46.

Misdorp, W. 1998. Canine mammary tumours: Protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Quarterly.* v.10, p.26-33.

Misdorp, E. R., Hellman, E. 1999. Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals. s.2, v.7, n.2, Washington, DC.

Mohr, A., Ripoli, F.L., Hammer, S.C., Willenbrock, S., Hewicker-Trautwein, M., Kielbowicz, Z., Escobar, H.M., Nolte, I. 2016. Hormone Receptor expression analyses in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissue by a bead based multiplex branched DNA assay: A gene expression study in fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *PLoS ONE* v.11 (9).

Monteiro, L.N., Rodrigues, M.A., Gomes, D.A., Salgado, B.S., Cassali, G.D. 2018. Tumor-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. *The Vet. Journal*, v.234, p.119-125.

Nguyen, F., Peña, L., Ibsch, C., Loussouarn, D., Gama, A., Rieder, N., Belousov, A., Campone, M., Abadie, J. 2018. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Res. Treat.* v.167, p.635-648.

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Diez, L., Gartner, F., Hellmen, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V., De Las Mulas, J.M. 2013. Canine mammary tumors: A review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER-2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet. Pat.* v.51, 127–145.

Pierini, A., Millanta, F., Zanforlin, R., Vannozzi, I., Marchetti, V. 2017. Usefulness of cytologic criteria in ultrasound-guided fine-needle aspirates from subcentimeter canine mammary tumors. *Journ. of Vet. Diag.* 29 (6):869-873.

Queiroga, F., Lopes, C. 2002. Tumores mamários caninos – novas perspectivas. In: Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras. Anais... p.183-190.

Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M., Goldschmidt, M. H. 2012. A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Vet. Pathol.*, v.49 (2), p.330-340.

Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R. P., Wolfe L. G. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.2196-2200.

Seung, B.J., Lim, H.Y., Shim, J., Kim, H.W., Cho, S.H., Kim, S.H., Sur, J.H. 2018. CD204- expressing tumor - associated macrophages are associated with malignant, high-grade, and hormone receptor – negative canine mammary gland tumors. *Vet. Pathology*. v.55 (3), p.417-424.

Sleeckx, N., Rooster, H., Veldhuis, K.E.J.B., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L. 2011. Canine Mammary Tumors, an Overview. *Reprod. Domest. Anim.* v.46, n. 6, p. 1112-3.

Sonremo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J., Goldschmidt, M.H. 2009. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet. Comp. Oncol.* v.7, p.162–172.

Quadro 1. Análise macroscópica dos carcinomas mamários caninos (Arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da FMVA – UNESP dos anos de 2015, 2016 e 2017: Número de animais e porcentagem por faixa etária.

Análise Macroscópica	Nº de animais	Número de animais (40)			
		Faixa etária e %			
		≤ 10 anos	%	>10 anos	%
Tamanho					
< 3 cm	14	9	64,3	5	35,7
3 a 5 cm	18	13	72,2	5	27,8
≥ 5 cm	8	4	50	4	50
Ulcerado					
Sim	5	3	60	2	40
Não	35	23	65,7	12	34,3
Necrose					
Sim	21	12	57,1	9	42,9
Não	19	14	73,7	5	26,3

Quadro 2: Classificação e graduação histológica de 40 tumores mamários caninos malignos e ocorrência de metástases para linfonodos regionais.

	Tumor misto	Túbulo papilífero	Sólido	Complexo	Total	% de tumores
Sem metástase nodal	8	3	7	5	23	
Grau histológico I	1	0	0	0	1	4,3
Grau histológico II	7	3	4	5	19	82,6
Grau histológico III	0	0	3	0	3	13,0
Com metástase nodal	2	7	3	5	17	
Grau histológico I	0	0	0	0	0	0,0
Grau histológico II	1	5	1	2	9	52,9
Grau histológico III	1	2	2	3	8	47,1

Quadro 3. Imunoexpressão de receptores de estrógeno α (RE α) no grupo controle (GC) e grupos experimentais (GE).

Receptores de estrógeno α	Grupos Experimentais				
	GC	GE1	GE2	GE3	GE4
Ausente	2	8	9	7	9
Presente	6	2	1	3	1
Total	8	10	10	10	10

GC – Glândulas mamárias com hiperplasia e ectasia ductal

GE1 – Carcinoma em tumor misto

GE2 – Carcinoma túbulo papilífero

GE3 – Carcinoma sólido

GE4 – Carcinoma complexo

Quadro 4: Imunoexpressão de macrófagos intratumorais (TAMs) no grupo controle (GC) e grupos experimentais (GE).

Macrófagos	GC	Grupos Experimentais			
		GE1	GE2	GE3	GE4
Ausente	6	7	0	0	0
Discreto	2	3	6	6	4
Moderado	0	0	4	4	5
Acentuado	0	0	0	0	1
Total	8	10	10	10	10

GC – Glândulas mamárias com hiperplasia e ectasia ductal

GE1 – Carcinoma em tumor misto

GE2 – Carcinoma túbulo papilífero

GE3 – Carcinoma sólido

GE4 – Carcinoma complexo

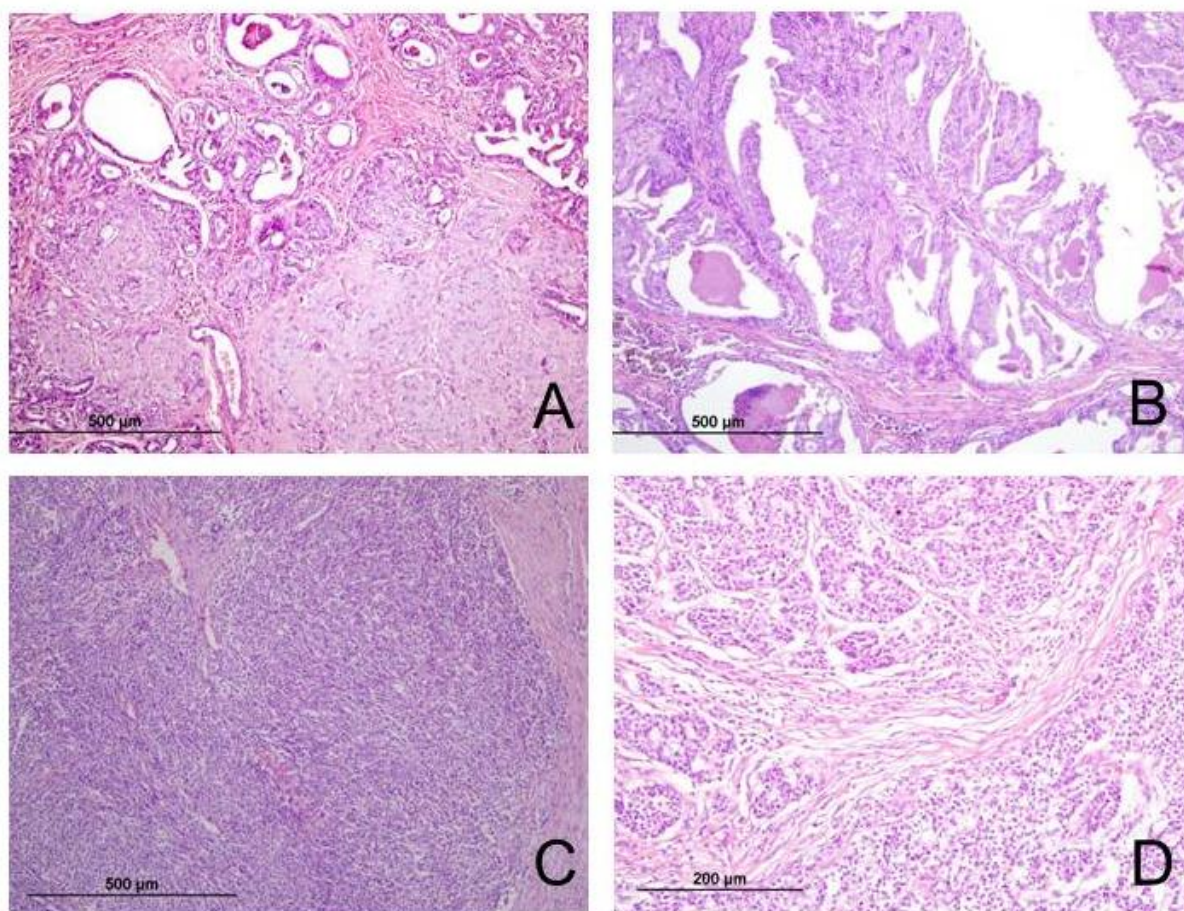


Fig. 1. Fotomicrografia. Coloração HE. Glândula mamária. (A) Carcinoma em tumor misto e área de metaplasia cartilaginosa. (B) Carcinoma túbulo papilífero com formações papilares na luz tubular. (C) Carcinoma sólido demonstrando arranjo epitelial sólido. (D) Carcinoma complexo, neoplasia epitelial associada à proliferação mioepitelial.

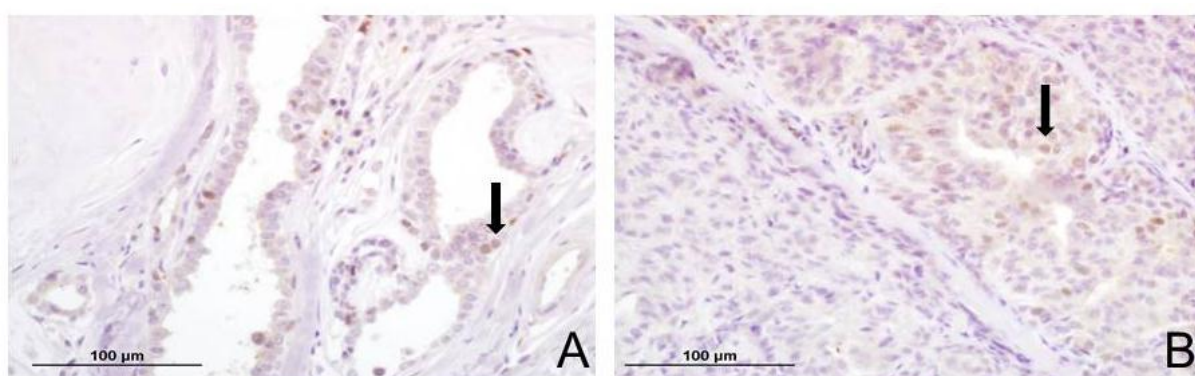


Fig. 2. Fotomicrografia. Imunomarcção de receptor de estrógeno α (RE α) (seta). (A) Carcinoma em tumor misto (GE1) reação nuclear positiva do epitélio ductal. (B) Carcinoma sólido (GE3) apresentando marcação nuclear positiva do epitélio tubular.

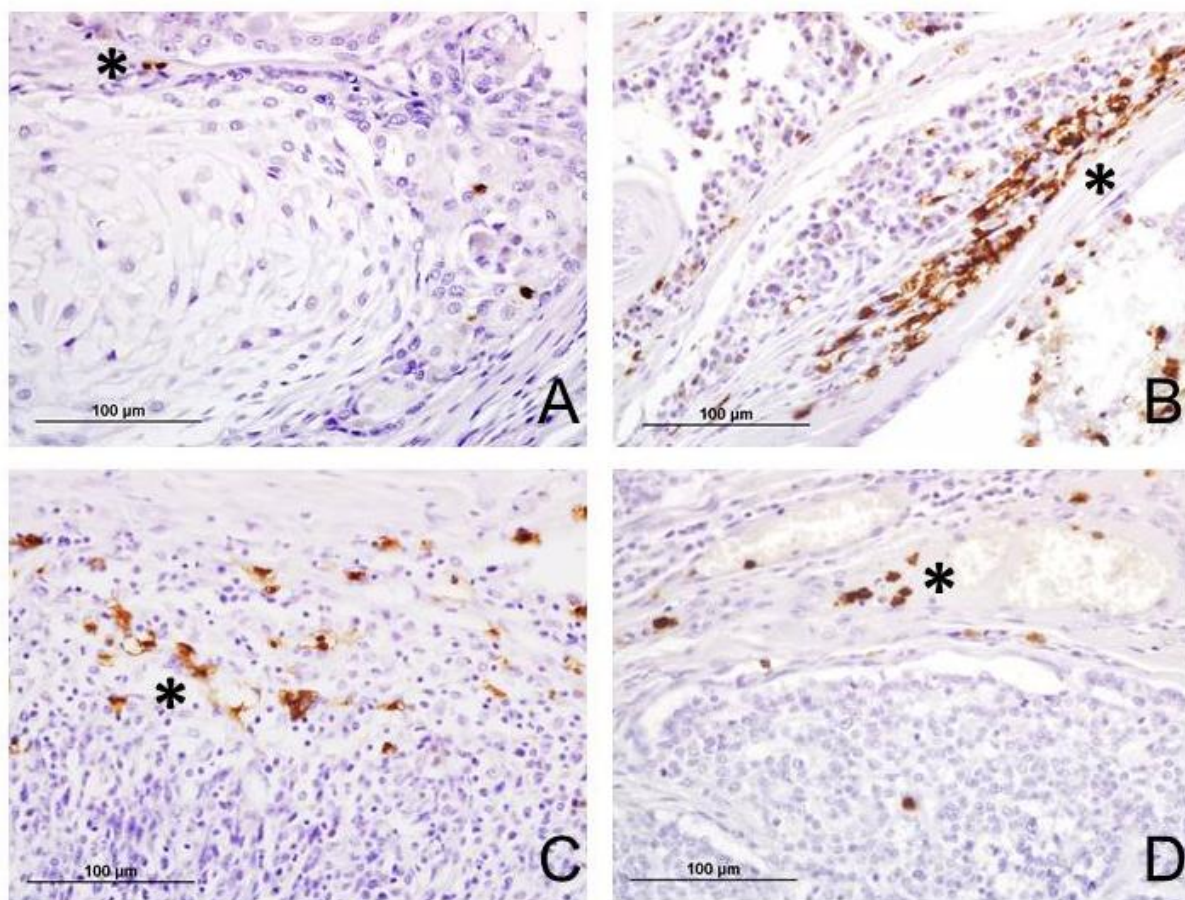


Fig. 3. Fotomicrografia. Imunomarcacão de macrófagos associados ao tumor mamário canino(*). (A) Carcinoma em tumor misto (GE1) exibindo TAMs em intensidade discreta junto ao componente epitelial. (B) Carcinoma túbulo papilífero (GE2), detecção de TAMs multifocal e moderada intratumoral e acentuada no estroma. (C) Carcinoma Sólido (GE3) apresentando imunomarcacão positiva de TAMs difusa acentuada. (D) Carcinoma complexo (GE4) exibindo TAMs de forma difusa moderada.

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise dos receptores de estrógeno e de progesterona em neoplasias mamárias caninas e expressão de macrófagos intratumorais**", Processo FOA nº 00721-2016, sob responsabilidade de Maria Cecília Rui Luvizotto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Fevereiro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 22 de Agosto de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 22 de Setembro de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Analysis of estrogen and progesterone receptors in canine mammary tumors and expression of intratumoral macrophages**", Protocol FOA nº 00721-2016, under the supervision of Maria Cecília Rui Luvizotto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 22, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 22, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 22, 2018.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br