

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO
CÂNCER EM MAMAS E LINFONODOS EM CADELAS COM
NEOPLASMAS MAMÁRIOS E SEU PERFIL CLÍNICO**

Marla Tereza Frasson

Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO
CÂNCER EM MAMAS E LINFONODOS EM CADELAS COM
NEOPLASMAS MAMÁRIOS E SEU PERFIL CLÍNICO**

Discente: Marla Tereza Frasson

Orientador: Profº Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Coorientadora: Profª. Dra. Josiane Moraes Pazzini

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

F843e	Frasson, Marla Tereza Expressão de fibroblastos associados ao câncer em mamas e linfonodos em cadelas com neoplasmas mamários e seu perfil clínico / Marla Tereza Frasson. -- Jaboticabal, 2021 45 f. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Andriago Barboza De Nardi Coorientadora: Josiane Moraes Pazzini 1. Oncologia. 2. Mamas câncer. 3. Fibroblastos. 4. Gânglios linfáticos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EXPRESSÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER EM MAMAS E LINFONODOS EM CADELAS COM NEOPLASMAS MAMÁRIOS E SEU PERFIL CLÍNICO.

AUTORA: MARLA TEREZA FRASSON

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADORA: JOSIANE MORAIS PAZZINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Dra. JOSIANE MORAIS PAZZINI (Participação Virtual)
Universidade dos Grandes Lagos - UNILAGO / São José do Rio Preto/SP


Profa. Dra. RAFAELA BORTOLOTTI VIERA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Pequenos Animais-UNICEP / São Carlos/SP


Prof. Dr. RAFAEL RICARDO HUPPEL (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNICESUMAR - Maringá/PR

Jaboticabal, 09 de dezembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marla Tereza Frasson, nascida no município de Santa Cruz do Rio Pardo, estado de São Paulo, aos trinta dias do mês de Janeiro de 1992. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP) em 2011 e obteve o título de Médica Veterinária em Abril de 2016. Entre os anos de 2016 e 2017, participou do Programa de Aperfeiçoamento em Cirurgia Veterinária de Animais de Companhia no Hospital Veterinário da UNICESUMAR, Campus Maringá. Ingressante em Março de 2018 como aluna regular do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV-UNESP), nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi. Atualmente é Médica Veterinária em Centro Universitário Central Paulista (UNICEP) – Câmpus São Carlos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar expressando minha gratidão à Deus e ao Universo pela oportunidade de aprendizado que recebi nesses dois últimos anos e meio.

Sou grata à Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Câmpus de Jaboticabal e a todos os funcionários que nos tratam sempre com carinho e educação, principalmente do Departamento de Medicina Veterinária e Pós-Graduação. Obrigada por tornarem nosso trabalho possível e mais fácil.

Sou infinitamente grata a todos os professores que compartilham seu conhecimento com o mundo e, em especial, aos mestres que se disponibilizaram a doar seu conhecimento em benefício do meu próprio. Professor Andriago Barboza De Nardi, mais do que oncologia e cirurgia, o senhor ensina sobre ética, amor à profissão, respeito aos animais e ao próximo, sempre com humildade. Sou grata pela oportunidade de conviver com o senhor durante esses dois anos. Obrigada por levar além a definição de orientador, transformando-a em não só alguém que ensina, mas alguém em quem se inspirar.

Josiane Moraes Pazzini, obrigada por ter sido minha primeira amiga em Jaboticabal e por ter me coorientado. Sou grata por poder contar com você em momentos difíceis. Os dias de conversas e trabalho no laboratório de imunohistoquímica ficarão para sempre na memória, deixando muita saudade. Amo você.

Rafael Ricardo Huppes, obrigada pela oportunidade na residência, por ter me ensinado a operar e, mais importante que tudo, obrigada por ter me apresentado à oncologia veterinária e cirurgia reconstrutiva. Hoje sou muito grata também à sua amizade e sinto saudades.

Às minhas amigas de Jaboticabal: isso não teria a menor graça sem vocês. Em especial: Stella Habib Moreira, Rafaela Bortolotti Viéra, Milena Giovana Magrin, Isabela Cristina Canavari, Noelia Talavera, Nathalia Freitas e Allana Feitoza da Silva. Tudo já valeu a pena apenas por ter conhecido vocês. Amigos são algumas das

maiores riquezas que um ser humano pode ter, e vocês são as minha riquezas. Amo vocês.

O dia mais esperado da semana: terça-feira. A melhor parte do mestrado com certeza foi participar do atendimento no Setor de Oncologia, que me ensinou que tratar não significa necessariamente curar, mas é tão importante quanto. Sou grata aos meus colegas oncologistas que tive o prazer de trabalhar: Gabriel Montanhim, Stella Habib Moreira, Rafaela Bortolotti Viéra, Milena Magrin, Isabela Canavari, Noelia Talavera, Pauline Lima, Oscar Sierra, Roana Ribeiro, Veronica Terrabuio, Pedro Cassino, Michelle Rocha, Larissa Máximo, Jorge Luis Alvarez Gómez, Igor Salardani, Gabriela Noronha de Toledo. E de outros setores também: Daniella Armani (“pão”) e Marcella Filézio.

Parte do meu aprendizado em Jaboticabal foi adquirido também na Clínica Anemais, onde fiz incontáveis plantões e tive a oportunidade de trocar conhecimento com excelentes profissionais, além das divertidas cirurgias em horários atípicos. Anelize Milaré Santi e família, sou grata por amarem e cuidarem do Pantufa em minha ausência. Além disso, sou grata pelas amizades que fiz aí, especialmente: Nathalia Freitas e Gabriela Machado.

O agradecimento mais difícil de fazer é à minha família, provavelmente porque é impossível explicar em um parágrafo o que vocês significam para mim. De forma resumida, obrigada por me apoiarem e me acolherem em todos os momentos. Sou grata por sempre tentarem aparar as arestas pontiagudas para me proteger das “espetadas” do mundo. Se os amigos são algumas das maiores riquezas que um ser humano pode ter, a família com certeza é a maior riqueza de todas. Faltam-me palavras para expressar a gratidão que sinto em ter uma família tão presente em minha vida. Lizandra Tereza Frasson, Terezinha Aparecida Portezan Frasson, Marco Antônio Frasson: eu amo vocês e sinto gratidão e orgulho pela família que formamos.

Caio Vidor Cassiano: obrigada por entrar em minha vida para torná-la mais alegre e com mais amor. Sinto admiração pela pessoa que você é, e me inspiro em sua determinação e bondade. Espero que possamos compartilhar muitas experiências juntos. Amo você.

Sou grata ao meu cachorro e melhor amigo Pantufa. Obrigada por reviver em mim a vontade de ser uma profissional melhor, diariamente. Muitas condutas foram planejadas pensando em você.

E, por fim, sou grata aos dias difíceis que me fizeram amadurecer, e aos dias felizes que me fizeram celebrar. Também sou grata a todos que cruzaram o meu caminho em cada um desses momentos e, principalmente, àqueles que acreditaram em mim quando eu já não acreditava mais.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO DA PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Neoplasmas mamários	2
2.2 Microambiente tumoral	4
2.3 Fibroblastos	5
2.4 Fibroblastos associado ao câncer (FACs).....	6
2.5 Marcador α -SMA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivos gerais.....	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1 Seleção das pacientes	10
4.2 Grupos experimentais	10
4.3 Estadiamento das pacientes	11
4.4.1 Critérios de inclusão	11
4.4.2 Critérios de exclusão	11
4.5 Procedimento cirúrgico.....	11
4.6 Avaliações macroscópicas	12
4.7 Avaliações microscópicas	12

4.7.1 Imunohistoquímica.....	12
4.7.2 Método de análise das lâminas.....	13
4.8 Análises estatísticas.....	13
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Expressão de fibroblastos e seu perfil clínico em linfonodos metastáticos e normais associado ao câncer de mama em cadelas"**, protocolo nº 3598/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 25 de agosto de 2020.

Vigência do Projeto	15/01/2020 a 30/05/2020
Espécie / Linhagem	Canino
Nº de animais	30
Peso / Idade	Idade de 3 a 17 anos. Peso não estipulado
Sexo	Fêmeas
Origem	Pacientes atendidos no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Jaboticabal, 25 de agosto de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

EXPRESSÃO DE FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER EM MAMAS E LINFONODOS EM CADELAS COM NEOPLASMAS MAMÁRIOS E SEU PERFIL CLÍNICO

RESUMO- Carcinomas mamários são neoplasmas de importância mundial, frequentes em cadelas e mulheres. Por se tratar de uma doença heterogênea, suas consequências variam de acordo com diferentes fatores prognósticos, como idade, comportamento biológico, presença de metástase e imunomarcção para determinados anticorpos. Sugere-se que os fibroblastos associados ao câncer (FACs) promovam a iniciação tumoral, progressão, e facilitam a formação de metástases; porém, seu papel no desenvolvimento tumoral ainda é desconhecido. Estas células expressam a marcação para α -actina do músculo liso (α -SMA), sendo que sua imunomarcção em diversos neoplasmas está associada ao pior prognóstico. Objetivou-se com este estudo avaliar se a intensidade de FACs em neoplasmas mamários e/ou linfonodos caninos tem relação com estadiamento mais avançados da doença e, consequentemente, pior prognóstico. Foram estudadas 18 cadelas com carcinoma mamários removidos por meio de mastectomia unilateral radical, sendo 8 com presença de metástase para linfonodos e 10 com linfonodos saudáveis. Foi realizada a imunohistoquímica dos neoplasmas mamários e dos linfonodos com o marcador α -SMA. Na avaliação microscópica classificou-se as imunomarcções em negativa, fraca, moderada e forte. As associações entre os padrões de marcação e os fatores clínicos foram avaliadas através do Teste Exato de Fisher. Os resultados das imunomarcções moderadas e fortes de α -SMA nos linfonodos foram associadas à presença de metástase (estadiamento IV), com valor de $p = 0,03$. A intensidade da marcação nas mamas estudadas não apresentou associação com a imunomarcção de seu linfonodo correspondente, com estadiamento IV ou com o tamanho do tumor. A idade das cadelas também não apresentou relação com estadiamentos III ou IV. A maior intensidade da imunomarcção de α -SMA nos linfonodos metastáticos parece estar relacionada com a presença de células neoplásicas decorrentes do processo de transição epitélio-mesenquimal e consequente aumento na população de miofibroblastos. As imunomarcções moderadas/fortes nas mamas não foram estatisticamente relacionadas ao estadiamento IV da doença, embora alguns tumores conhecidos como altamente agressivos tiveram imunomarcção forte para o marcador α -SMA. Conclui-se que o tamanho tumoral não influencia nas intensidades de imunomarcção de α -SMA nas mamas. Além disso, não houve associação entre a intensidade de marcação nas mamas e seu linfonodo correspondente. Porém, linfonodos metastáticos apresentam maiores intensidade de FACs.

Palavras-chave: α -SMA, câncer, carcinoma mamário, fibroblasto

EXPRESSION OF CANCER ASSOCIATED FIBROBLASTS IN BREAST AND LYMPH NODES IN BITCHES WITH BREAST NEOPLASMS AND THEIR CLINICAL PROFILE

ABSTRACT- Breast carcinomas are neoplasms of worldwide importance, common in bitches and women. As it is a heterogeneous disease, its consequences vary according to different prognostic factors, such as age, biological behavior, presence of metastasis and immunostaining for certain antibodies. It is suggested that cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote tumor initiation, progression, and facilitate the formation of metastases; however, its role in tumor development is still unknown. These cells express the α -smooth muscle actin (α -SMA) labeling, and their immunostaining in several neoplasms is associated with a worse prognosis. The objective of this study was to evaluate whether the intensity of CAFs in breast neoplasms and / or canine lymph nodes is related to more advanced stages of the disease and, consequently, a worse prognosis. Eighteen bitches with breast carcinoma removed by means of radical unilateral mastectomy were studied, 8 with metastasis to lymph nodes and 10 with healthy lymph nodes. Immunohistochemistry of breast neoplasms and lymph nodes was performed with the α -SMA marker. In the microscopic evaluation, immunostaining was classified as negative, weak, moderate and strong. Associations between marking patterns and clinical factors were assessed using Fisher's exact test. The results of moderate and strong α -SMA immunostaining in lymph nodes were associated with the presence of metastasis (stage IV), with a p-value of 0.03. The intensity of the marking on the studied breasts was not associated with the immunostaining of its corresponding lymph node, with stage IV or with the size of the tumor. The age of the dogs was also not related to staging III or IV. The greater intensity of α -SMA immunostaining in metastatic lymph nodes seems to be related to the presence of neoplastic cells resulting from the epithelial-mesenchymal transition process and a consequent increase in the population of myofibroblasts. Moderate / strong immunostaining in the breasts were not statistically related to stage IV of the disease, although some tumors known to be highly aggressive had strong immunostaining for the α -SMA marker. It is concluded that the tumor size does not influence the immunostaining intensities of α -SMA in the breasts. In addition, there was no association between the intensity of marking on the breasts and its corresponding lymph node. However, metastatic lymph nodes have greater intensity of CAFs.

Keywords: α -SMA, cancer, mammary carcinoma, fibroblast

1. INTRODUÇÃO

Neoplasmas mamários afetam mulheres e cadelas em todo o mundo e, mesmo com o diagnóstico precoce e avanços na terapia, muitos casos são resistentes ao tratamento e a doença progride para metástase (Amornsupak et al., 2017).

O prognóstico dos tumores mamários é influenciado por diversos fatores, como idade do paciente, tipo e graduação histológica, estadiamento clínico, tamanho do tumor, índice mitótico, presença de metástases, dentre outros. O tratamento de escolha para as cadelas com neoplasmas mamário, exceto em casos de carcinoma inflamatório, é a cirurgia, mas pacientes com metástases regionais ou distantes ou com subtipos agressivos podem ser beneficiados por quimioterapia adjuvante (Nunes et al., 2019).

A via linfática é a principal rota para metástase de tumores mamários, portanto, embora a drenagem linfática das glândulas mamárias em cadelas seja complexa, faz-se importante a avaliação dos linfonodos regionais e sentinelas para a determinação do prognóstico e do tratamento ideal (Araújo et al., 2015; Bulman-Fleming, 2020).

O desenvolvimento de neoplasmas não depende exclusivamente da mutação celular, mas sim da transformação da matriz extracelular (MEC) a favor da progressão tumoral (Franco et al., 2010). O estroma celular que circunda as células neoplásicas, cria o microambiente tumoral necessário para suas características malignas e estimula seu desenvolvimento (Yoshimoto et al., 2017).

Existem evidências de que os fibroblastos participam ativamente do desenvolvimento tumoral, desde a iniciação até a progressão tumoral e formação de metástase. Seu conhecimento é relativamente novo, e sua participação e vias não estão totalmente esclarecidas (Xing et al., 2010). Esses fibroblastos ativados, chamados de fibroblastos associados ao câncer (FACs) tem um papel importante nos estágios iniciais da tumorigênese. Com a progressão tumoral, a arquitetura dos tecidos se torna distorcida com acúmulo aberrante de componentes da matriz extracelular (MEC), modificando o microambiente tumoral a favor do tumor (Xing et al., 2010; Marsh et al., 2013).

Os FACs são capazes de produzir uma MEC de suporte ao tumor, que promove o crescimento, expansão e disseminação da população de células epiteliais pré-neoplásicas (Franco et al., 2010).

Estudos que correlacionem o microambiente tumoral em carcinomas mamários e em linfonodos, com o seu perfil clínico e prognóstico, são importantes para o conhecimento dos mecanismos na carcinogênese e colaboram na predição de prognóstico destes pacientes. Entender o papel dos FACs em neoplasmas pode ser duplamente benéfico pois os miofibroblastos parecem estar relacionados não só com o prognóstico, mas também com a resposta a terapia (Gonda et al., 2010).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a imunomarcagem de α -SMA em neoplasmas mamários, bem como nos linfonodos regionais das pacientes estudadas, correlacionando a intensidade da marcação com a clínica apresentada pela paciente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasmas mamários

Câncer de mama é o neoplasma mais prevalente em mulheres e cadelas (Abdelmegeed e Mohammed, 2018) e, mesmo com o diagnóstico precoce e avanços na terapêutica, muitos casos são resistentes ao tratamento e a doença progride para metástase (Amornsupak et al., 2017).

O comportamento biológico do tumor mamário é semelhante entre mulheres e cadelas, como a idade de aparecimento da doença, etiologia, curso da doença, fatores prognósticos e até mesmo mutações genéticas e características moleculares (Abdelmegeed e Mohammed, 2018). Sendo assim, cães são um excelente modelo experimental para mulheres no que diz respeito a neoplasmas mamários e, portanto, é de suma importância conhecer os marcadores que podem predizer o risco de metástase nessas pacientes (Amornsupak et al., 2017; Abdelmegeed e Mohammed, 2018).

O prognóstico dos tumores mamários é influenciado por diversos fatores, incluindo idade; tipo e graduação histológica; estadiamento clínico; tamanho do tumor;

comportamento do tumor; índice mitótico; presença de metástases regionais ou distantes; densidade vascular e marcadores moleculares (Nunes et al., 2019). A expressão de biomarcadores no estroma pode estar relacionada com subtipos particulares de tumor de mama (Folgueira et al., 2013). Há evidências de que um tumor benigno pode avançar para carcinoma *in situ*, carcinoma não invasivo e, por fim, carcinoma invasivo (Bulman-Fleming, 2020).

O fator de risco mais significativo na ocorrência de tumor de mama em cadelas é a exposição hormonal, haja vista que cadelas castradas antes do primeiro estro apresentam apenas 0,5% de risco de desenvolver a doença. Outros fatores de risco incluem idade avançada, raça, obesidade aos 9 meses a 1 ano de idade e dieta com carne vermelha (Bulman-Fleming, 2020).

A via linfática é a principal rota para metástase de neoplasmas mamários, sendo que sua presença é o mais importante parâmetro prognóstico (Mundim et al., 2016). A drenagem linfática das glândulas mamárias em cadelas é complexa, portanto, a avaliação do linfonodos regionais e sentinelas é fundamental para a determinação do prognóstico e, conseqüentemente, do tratamento ideal (Araújo et al., 2015, Bulman-Fleming, 2020).

Os sítios mais comuns de metástases de neoplasmas mamários são linfonodos regionais e pulmão; embora fígado, baço, adrenais, rim, ossos e sistema nervoso central também possam ser acometidos (Nunes et al., 2019; Borecka et al., 2020).

O diagnóstico dos neoplasmas mamários é obtido através da histopatologia; no entanto, em algumas situações são necessárias ferramentas mais avançadas de diagnóstico para conseguir informações precisas sobre o tipo histológico e prognóstico da doença, o que influencia diretamente na escolha do tratamento (Borecka et al., 2020). Uma das técnicas que proporcionam essas informações é a imunohistoquímica, que consiste na ligação entre um anticorpo específico e um antígeno presente nas células tumorais (Ramos-Vara, 2005).

O tratamento de escolha para as cadelas com tumor de mama, exceto em casos de carcinoma inflamatório, é a cirurgia. Pacientes com metástases regionais ou distantes, com subtipos agressivos, como carcinosarcoma, carcinoma micropapilar, carcinoma sólido ou carcinoma tubular de alto grau, ou com carcinoma em tumor misto contendo áreas malignas são beneficiados por quimioterapia adjuvante (Nunes et al.,

2019). A castração associada à mastectomia em pacientes com tumor de mama apresenta controvérsia em relação à sua vantagem, embora alguns autores justifiquem seu benefício devido a diminuição da influência de hormônios em neoplasmas que apresentam receptores de estrógeno (Karayannopoulou e Lafioniatis, 2016).

2.2 Microambiente tumoral

Os tumores são organismos complexos, e o termo microambiente tumoral se refere à interação entre os componentes celulares e moleculares presentes no tecido neoplásico (Hanahan e Weinberg, 2011). O tecido tumoral contém não apenas células tumorais, mas também fibroblastos, células musculares lisas, células imunes e inflamatórias, adipócitos e células endoteliais (Franco et al., 2010; Yoshimoto et al., 2017). O estroma celular tumoral, que circunda as células neoplásicas, cria o microambiente tumoral necessário para suas características malignas e estimulam seu desenvolvimento (Yoshimoto et al., 2017).

O estroma da mama saudável é composto por fibroblastos, adipócitos, células endoteliais, pericitos, componentes imunes e nervos. Nos tumores de mama, ocorre aumento do número de fibroblastos (incluindo miofibroblastos), infiltração de células inflamatórias, angiogênese e remodelamento da MEC; ou seja, há a alteração do microambiente tumoral de forma a promover mudanças nas atividades das células epiteliais e facilitar a proliferação, sobrevivência, diferenciação, invasão e capacidade metastática das células cancerígenas (Franco et al., 2010).

O microambiente tumoral influencia o comportamento da neoplasia mamária através de interações solúveis e mediadas por células, ou seja, as células tumorais alteram a característica do estroma adjacente para criar um microambiente de suporte ao tumor (Xing et al., 2010).

Transição epitélio-mesenquimal (TEM) é o processo em que as células epiteliais ganham características mesenquimais, como a perda da adesão celular. O evento de fibrose e a diferenciação das células epiteliais em miofibroblastos são considerados exemplos de TEM, tal como neoplasmas com alterações no estroma tumoral (Xing et al., 2010).

Diversos tipos celulares podem servir como precursores de FACs no estroma tumoral, incluindo células de músculo liso, células endoteliais, fibroblastos e até células epiteliais através da transição epitélio-mesenquimal. Essa transformação ocorre sobre a influência de citocinas locais e mediadores inflamatórios (Gonda et al., 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram a indução à proliferação de fibroblastos e alteração genética de fibroblastos *naïve* a partir de células epiteliais cancerígenas. A aquisição de propriedades de miofibroblastos pelos fibroblastos *naïve* aumenta a habilidade dessas células a se relacionar com células cancerígenas e promover invasão (Fromigue et al., 2003; Gonda et al., 2010).

2.3 Fibroblastos

Fibroblastos são células que fornecem a integridade estrutural dos tecidos, devido a sua capacidade de remodelamento da matriz extracelular (MEC) e produção da membrana basal. Esta última serve como barreira protetora no epitélio especializado, permitindo polaridade, especificidade e funcionalidade do tecido (Marsh et al., 2013).

Os fibroblastos secretam vários fatores de crescimento, autócrinos e parácrinos, que regulam a própria atividade e o crescimento das células circundantes (Xing et al., 2010). Por conter metabolismo ativo, são capazes de sintetizar, remodelar e degradar componentes da MEC, por meio da produção de colágeno, elastina, fibronectina, integrinas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas (laminina), metaloproteinase de matriz, tecido inibidor de metaloproteinase (Xing et al., 2010; Marsh et al., 2013).

É conhecido que, durante a regeneração tecidual, os fibroblastos são diferenciados em sua forma ativa, os miofibroblastos, ganhando a capacidade de remodelar a MEC e induzir a angiogênese (Franco et al., 2010). Por passar a expressar filamento de actina, exerce a habilidade de contração tecidual favorecendo a cicatrização (Marsh et al., 2013).

Esta diferenciação é estimulada por meio de sinais parácrinos, liberados quando há injúria, ou reparação tecidual, sendo o fator de crescimento de transformação- β (TGF- β) o mais potente deles (Franco et al., 2010). Neste processo

também há a participação de outros fatores de crescimento angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento derivado das plaquetas), estimulando a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais (Newman et al., 2011).

Os miofibroblastos podem originar-se tanto dos fibroblastos residentes no tecido quanto de células precursoras localizadas na medula óssea, sendo que a maioria das células com fenótipo de miofibroblastos são derivadas de fibroblastos locais (Gonda et al., 2010). Após a reparação tecidual, os miofibroblastos entram em apoptose e ocorre o remodelamento tecidual (Franco et al., 2010).

2.4 Fibroblastos associados ao câncer (FACs)

Os fibroblastos associados ao câncer (FACs) são fibroblastos ativados que expressam fenótipo de miofibroblasto (Hao et al., 2016; Mundim et al., 2016; Yoshimoto et al., 2017). De maneira mais simples, o termo refere-se aos miofibroblastos associados às células de carcinoma. Sua aparência é de uma célula arredondada e em forma de fuso com aspecto de célula mesenquimal. Eles são os principais componentes celulares do estroma tumoral, constituindo uma importante parte do tumor, como 50 a 70% da massa tumoral (Gonda et al., 2010). Diferente dos fibroblastos normais e miofibroblastos, os FACs são perpetuamente ativados, não voltando a um fenótipo normal e nem sofrendo apoptose (Xing et al., 2010).

No câncer, a origem do miofibroblasto permanece controversa, mas sabe-se que fatores de crescimento estão relacionados à invasividade das neoplasias mamárias (Franco et al., 2010), além do aumento da sua expressão estar correlacionada com menor taxa de sobrevida global, ainda que os estudos sejam com poucos casos (Amornsupak et al., 2017).

É sugerido que os FACs contribuam para a iniciação tumoral; proliferação, migração e invasividade das células cancerígenas; angiogênese e linfangiogênese tumoral; inflamação induzida pelo tumor; reprogramação metabólica do microambiente tumoral; e resistência terapêutica (Niemieć et al., 2018; Kashima et al., 2019). Essa contribuição se dá pela secreção de moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, além de proteínas e do

remodelamento da MEC em benefício do tumor e da disseminação de metástase (Amornsupak et al., 2017; Yoshimoto et al., 2017; Kashima et al., 2019).

Apesar de fibroblastos não associados à tumores parecerem ter participação no aumento da proliferação de células epiteliais malignas, eles não são capazes de iniciar a transformação maligna de células epiteliais. Um processo de ativação parece ser necessário para o fibroblasto desenvolver seu papel pró-tumorigênico (Gonda et al., 2010).

Já se sabe que para ocorrer o câncer não basta apenas a alteração de uma célula, mas sim a transformação da MEC para permitir a progressão tumoral (Franco et al., 2010). Os FACs são um tipo especializado de fibroblastos que participam da formação do microambiente tumoral e possuem um perfil de expressão gênica particular, passando a expressar mais actina de músculo liso (Mundim et al., 2016). Eles são capazes de produzir uma MEC de suporte ao tumor, que promove o crescimento, expansão e disseminação da população de células epiteliais pré-neoplásicas (Franco et al., 2010).

Os FACs encontrados em diferentes tipos de câncer são altamente heterogêneos e possivelmente são derivados de fibroblastos residentes, células epiteliais, células endoteliais ou células mesenquimais (Xing et al., 2010). A presença de reação desmoplásica e tumor rico em estroma está associado a pior prognóstico em tumor de mama (Folgueira et al. 2013).

Embora os FACs não sejam necessariamente células malignas, são capazes de promover o crescimento tumoral e metástase (Xing et al., 2010). O processo metastático pode não estar relacionado diretamente com a invasão tumoral, mas sim relacionada à TEM à medida que permite às células cancerígenas se diferenciarem e adquirirem capacidade de migração e invasividade (Sasaki et al., 2018). Logo, é possível que os FACs sejam células precoces presentes em glândulas mamárias normais e que tenham capacidade de responder aos sinais das células cancerígenas para iniciar e desenvolver o câncer (Xing et al., 2010).

A população celular de linfonodos normais consiste em linfócitos e células inflamatórias (histiócitos), além de células fibroblásticas reticulares localizadas próximo à capsula. No microambiente de linfonodos metastáticos, os FACs foram associados às células de carcinoma (Mundim et al., 2016).

Kashima et al. (2019) avaliaram FACs em carcinoma de células escamosas de esôfago em humanos e demonstraram que o acúmulo de FAC está diretamente relacionado com o aumento de metástase em linfonodos. Logo, outro grupo de pesquisadores (Mundim et al., 2016), encontraram expressão de fibroblastos localizados em linfonodos metastáticos semelhantes aos fibroblastos presentes no tumor primário. Além disso, o marcador α -SMA foi negativo em linfonodos não metastáticos. Esses resultados corroboraram com a hipótese de que os linfonodos manifestam um estroma tumoral semelhante ao tumor primário para que haja a invasão metastática.

2.5 Marcador α -SMA

O desafio em identificar exatamente os FACs com apenas um marcador ocorre devido à sua origem em diversas populações celulares, ao tecido em que o fibroblasto se desenvolveu, e ao seu estado de ativação, que pode aumentar a possibilidade de que tipos específicos de FACs podem estar associados a diferentes frequências de marcadores (Folgueira et al., 2013). Sendo assim, os FACs podem ser identificados por diversos marcadores, como α -SMA, vimentina, receptor alfa de fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR- α), receptor beta de fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR- β), proteína 1 específica de fibroblasto (FSP-1), proteína de ativação de fibroblasto (FAP) (Marsh et al., 2013).

Apesar disso, o marcador mais utilizado para identificar FACs é o α -smooth muscle actin (α -SMA), que é um marcador específico para miofibroblasto (Yoshimoto et al., 2017). A expressão de α -SMA difere fibroblasto normal de miofibroblasto porque estes últimos passam a expressar mais actina de músculo liso (Mundim et al., 2016).

A expressão deste marcador ocorre principalmente em células endoteliais ou mioepiteliais em tecidos benignos, por ser uma proteína de actina de músculo liso. Também é encontrado em fibroblastos localizados em neoplasmas mamários (FACs) com variados graus de expressão (Amornsupak et al., 2017).

Os FACs contribuem para o prognóstico de doenças à medida que a aquisição marcação de α -SMA correlaciona-se com a transição epitélio-mesenquimal. Em humanos, sua presença está diretamente relacionada com a invasividade em tumores de mama sua expressão foi elevada em alguns tumores malignos (Hao et al., 2016).

Amornsupak et al. (2017), em seu trabalho, encontraram um aumento da expressão de fibroblastos α -SMA positivos em tecidos malignos (tumores de mama inflamatórios e não inflamatórios) quando comparado a tecidos benignos, sendo que a expressão deste marcador foi considerado um fator de risco por aumentar a chance de metástase em pacientes com tumor de mama.

Sasaki et al. (2018) avaliaram os FACs em diversos tipos tumorais humanos (melanoma, carcinoma basal, carcinoma de células escamosas) utilizando o marcador α -SMA. No que concerne à medicina veterinária, Gama et al. (2003) testaram o marcador α -SMA em neoplasmas mamários de cadelas, a fim de conhecer melhor a histogênese tumoral.

Apesar da importância de classificar em quais tecidos mamários o marcador α -SMA apresenta maior positividade, ainda faltam estudos comparando a marcação à clínica dos pacientes, como desenvolvimento de metástase, fatores prognósticos e sobrevida global. Dessa forma, estudos como este são necessários na Medicina Veterinária a fim de identificar a expressão de fibroblastos associados ao câncer e seu perfil clínico em linfonodos metastáticos e normais neoplasmas mamários em cadelas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Observar a associação entre o padrão de imunomarcacão dos FACs através do marcador α -SMA em carcinomas mamários e em linfonodos metastáticos ou não de cada cadela, e verificar se a presença de FACs em neoplasmas mamários e/ou linfonodos caninos tem relação com estadiamento clínico mais avançados da doença e, consequentemente, piores prognósticos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se o padrão de intensidade de imunomarcacão de α -SMA nos neoplasmas mamários está relacionado ao padrão de seu linfonodo correspondente.

- Buscar associação entre os estadiamentos III e IV das pacientes e suas idades.
- Verificar se as imunomarcações moderadas/fortes nos linfonodos estão relacionadas ao estadiamento IV.
- Verificar se as imunomarcações moderadas/fortes nas mamas estão relacionadas ao estadiamento IV.
- Associar o tamanho dos tumores no momento da mastectomia com a intensidade da imunomarcação de FACs nas mamas estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das pacientes

Foram selecionadas amostras provenientes do Setor de Patologia – Unesp/FCAV de 30 pacientes caninas, fêmeas, que foram atendidas no Setor de Obstetrícia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - Unesp/FCAV entre agosto de 2016 e setembro de 2017. Todas as pacientes apresentavam neoplasmas mamários e foram submetidas ao procedimento de mastectomia conforme descrito na literatura (Fossum, 2015) e as amostras escolhidas correspondentes para cada cadela eram de uma mama com neoplasma mamário e o linfonodo regional (inguinal ou axilar, o mais próximo do neoplasma a ser avaliado).

Previamente ao procedimento cirúrgico, todas as cadelas foram submetidas ao estadiamento clínico tumoral, com avaliação hematológica (hemograma e perfis renal e hepático, como creatinina, alanina aminotransferase, ureia e proteína total), radiografia torácica em três projeções e ultrassonografia abdominal.

4.2 Grupos experimentais

As pacientes foram selecionadas de acordo com o tipo histológico do neoplasma mamário e separadas em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de metástase em linfonodo. A sobrevivência global das pacientes foi obtida por meio de contato telefônico com os tutores, quando possível; os demais dados, como idade, raça, diagnóstico, tamanho do tumor, grau histológico, status do linfonodo,

foram obtidos no sistema operacional do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - Unesp/ FCAV ou no laudo histológico das pacientes. Para as análises estatísticas, foram consideradas idosas as pacientes com 9 anos ou mais.

4.3 Estadiamento das pacientes

O estadiamento clínico das pacientes foi realizado conforme descrito em Rutteman et al. (2011), em que o estágio tumoral é mensurado pelo tamanho do tumor, comprometimento linfático e metástase à distância, conforme detalhado na tabela 1.

Quadro 1 – Estadiamento clínico dos neoplasmas mamários em cadelas.

Estádio	Tamanho do tumor	Status do linfonodo	Metástase à distancia
1	< 3 cm (T1)	N0	M0
2	3 – 5 cm (T2)	N0	M0
3	> 5 cm (T3)	N0	M0
4	Qualquer T	N1 (positivo)	M0
5	Qualquer T	Qualquer N	M1 (presente)

Adaptada de: Rutteman et al. (2011). T= tamanho; N= linfonodo; M = metástase.

4.4.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: cães fêmeas, laudo histopatológico de carcinoma mamário, radiografia torácica pré-cirúrgica, mastectomia com remoção de pelo menos um linfonodo.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas do experimento todas as pacientes que tiveram lesões mamárias não neoplásicas, neoplasias de origem mesenquimal ou de célula redonda, tumores mamários benignos e carcinomas inflamatórios.

4.5 Procedimento cirúrgico

O tratamento cirúrgico realizado em todas as cadelas foi a mastectomia unilateral total, associada à linfadenectomia dos linfonodos axilares e/ou inguinais, de

acordo com o descrito em Fossum (2015). Após o procedimento cirúrgico, os materiais foram acondicionados em formol e encaminhados ao Setor de Patologia – Unesp/FCAV, onde foram processados para avaliação histopatológica.

4.6 Avaliações macroscópicas

Por se tratar de um estudo retrospectivo, os aspectos macroscópicos considerados neste trabalho, como tamanho dos neoplasmas, foram adquiridos pela descrição do patologista no laudo de histopatologia.

4.7 Avaliações microscópicas

Os materiais foram encaminhados para avaliação histopatológica no Setor de Patologia – Unesp/FCAV, onde foi realizada a coloração histoquímica com hematoxilina e eosina para o diagnóstico histopatológico das lesões em cadeia mamária e linfonodos de cada paciente.

4.7.1 Imunohistoquímica

Os blocos parafinizados contendo fragmentos de tumores de mama e linfonodos foram cortados em secções de 5 µm de espessura e montados em lâminas sinalizadas comercialmente. Após as lâminas ficarem *overnight* em estufa à 67°C, foram desparafinizadas em xilol e álcool, hidratadas em água corrente durante 10 minutos e recuperadas em solução retrível (Novocastra™ Leica) 10% em pH 6,0 aquecida em banho-maria durante 20 minutos.

A imunohistoquímica foi realizada utilizando um kit comercial de Sistema de Detecção de Polímero Novolink (Leica Biosystems). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por uma incubação de 10 minutos em H₂O₂ (Peroxidase Block) e, subsequentemente, foi realizada a incubação em 10 minutos com soro para o bloqueio das proteínas (Protein Block). Utilizou-se o anticorpo monoclonal de murino anti-αSMA (clone 1A4) (número de catálogo A2547, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, EUA) a uma diluição de 1: 2.000. As secções foram incubadas com anticorpo durante 2 horas. Após, foram incubadas com polímero soro de ponte (Post primary) durante 30 minutos à temperatura ambiente (15-25 ° C) e depois com o Polímero (Novolink™ Polymer) por 30 min em temperatura ambiente.

O cromógeno diaminobenzidina (Novolink™ DAB substrato Buffer) foi utilizado para visualização, durante aproximadamente 90 segundos à temperatura ambiente. As secções foram lavadas durante 10 minutos em água corrente e então contrastadas com hematoxilina de Harrys. Após, foram lavadas novamente em água corrente durante 10 minutos e desidratadas e diafanizadas em álcool e xilol. As lâminas foram então montadas e observadas em microscópio óptico.

4.7.2 Método de análise das lâminas

A expressão de α -SMA em cada seção foi observada sob microscópio óptico da marca Olympus. A leitura das lâminas foi feita por um avaliador cego, em que a expressão de α -SMA foi graduada como sendo a porcentagem de fibroblastos positivos no estroma da lesão. A proporção de positividade nas células imunomarcadas foram classificadas de 0% (negativo), fraca (de 1% a 20%), moderada (de 21% a 50%), e alta (de 51% a 100%), como descrito em Sasaki et al. (2018).

Para as análises estatísticas, as imunomarcações foram novamente classificadas em dois grupos, nos quais os padrões classificados anteriormente como negativos e fracos foram considerados como marcação baixa, e os padrões moderados e fortes foram considerados como marcação alta.

4.8 Análise estatística

As associações entre as variáveis categóricas foram realizadas por meio do Teste Exato de Fisher, sendo adotado um nível de significância igual a 5%. O grau de associação entre as variáveis significativas foi obtido por meio do Coeficiente de Cramer'V. Todas as análises foram realizadas no Software R por meio do pacote "vcd" (R Core Team, 2020).

5. RESULTADOS

Das 30 pacientes selecionadas, três não tiveram seus blocos parafinados correspondente ao material necessário encontrado; sete foram excluídas, uma vez que as amostras de mama não tinham material correspondente fidedigno ao seu

respectivo linfonodo. Uma paciente foi excluída devido às amostras serem apenas correspondentes às margens tumorais, e uma paciente foi excluída pela qualidade do bloco não permitir imunomarcção adequada da lâmina de imunohistoquímica. Logo, o estudo foi realizado com 18 cadelas.

A idade média das pacientes foi de 10 anos, variando entre 3 e 17 anos, conforme mostrado na Figura 1.

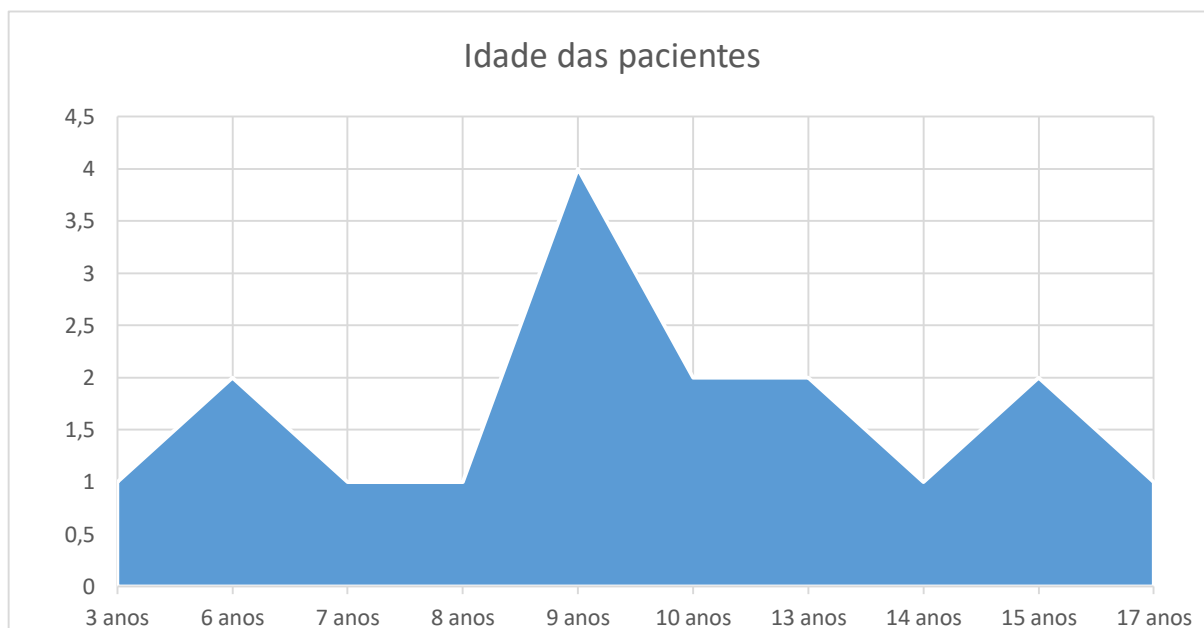


Figura 1 – Idade das pacientes submetidas à mastectomia e diagnosticadas com neoplasmas mamários, que foram incluídas no experimento. UNESP/FCAV, 2020.

Uma das características avaliadas no trabalho foi o padrão racial das cadelas, de modo que a mais prevalente foi a sem raça definida (SRD). No entanto, 66,7% dos pacientes corresponderam à pacientes de raça pura. As raças estão demonstradas na Figura 2.

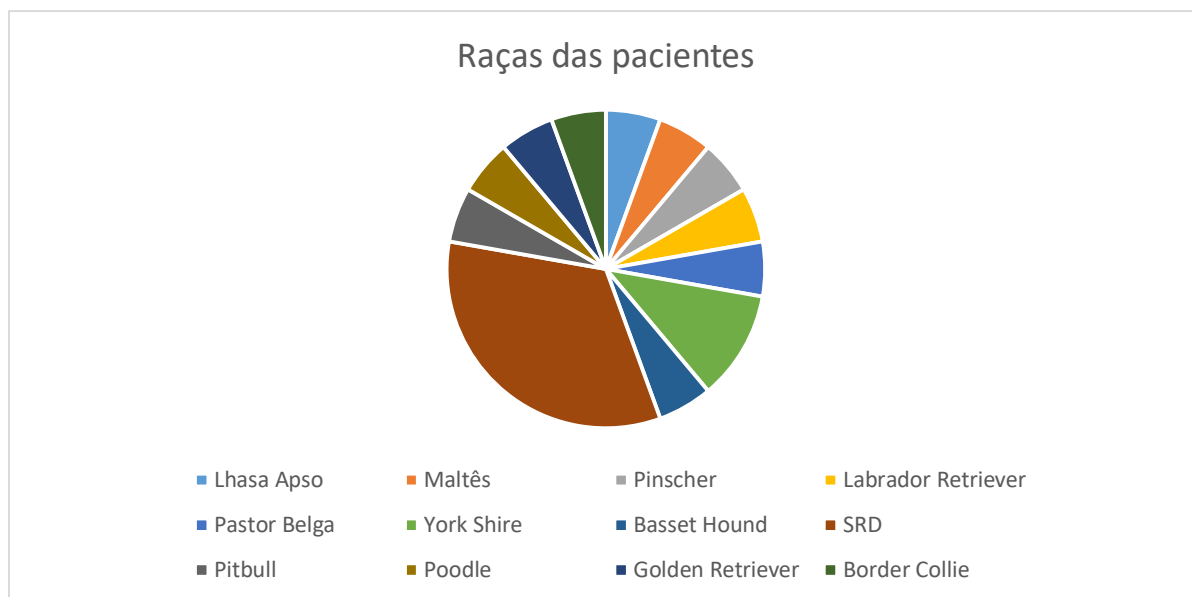


Figura 2 – Prevalência dos padrões raciais das pacientes que participaram do experimento. A raça mais prevalente foi SRD, com seis pacientes, seguida de York Shire, com duas pacientes. As demais raças apresentaram apenas um exemplar de cada neste experimento. UNESP/FCAV, 2020.

As cadelas avaliadas possuíam neoplasmas mamários de diferentes tipos histológicos, que estão demonstrados na Figura 3.

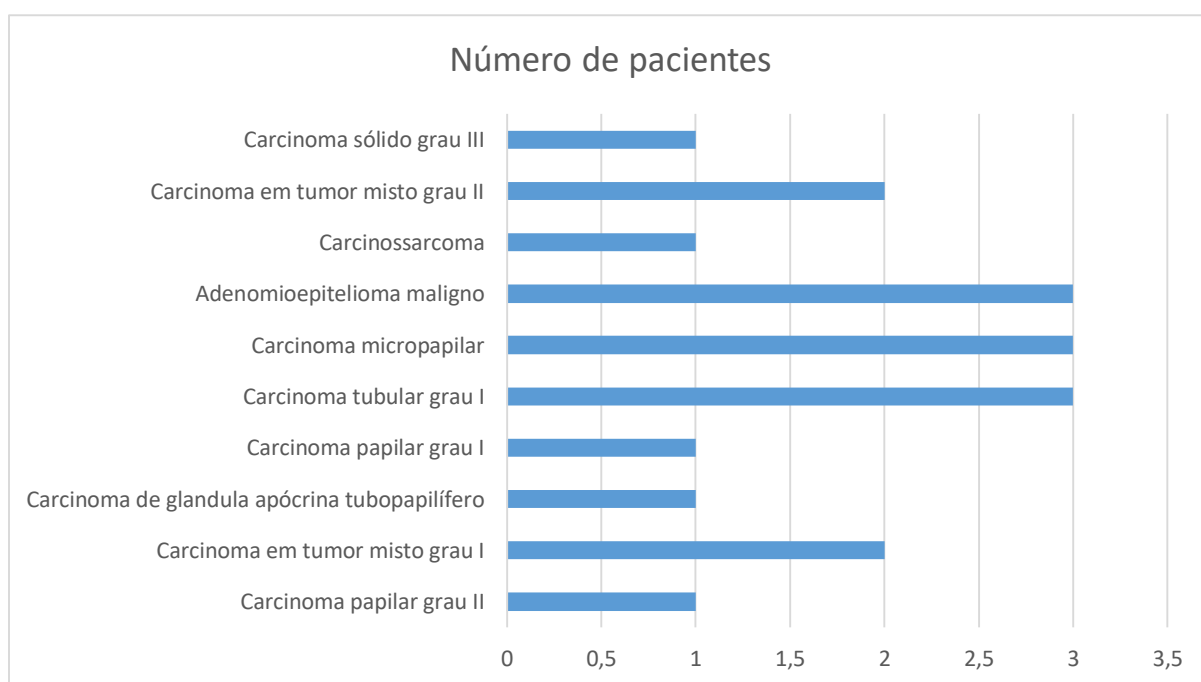


Figura 3 – Prevalência dos tipos histológicos dos neoplasmas mamários das cadelas inclusas no trabalho. Adenomioepitelioma maligno, carcinoma micropapilar e carcinoma tubular grau I foram os tipos histológicos mais prevalentes, com três pacientes, seguidos por carcinoma em tumor misto grau I e grau II, com duas pacientes. Os demais tipos histológicos apresentaram apenas um exemplar de cada. UNESP/FCAV, 2020.

A Figura 4 evidencia as mamas que foram mais acometidas com neoplasmas malignos. Embora algumas cadelas apresentassem neoplasmas em mais de uma mama, este estudo priorizou a mama que apresentasse laudo histológico com maior malignidade.

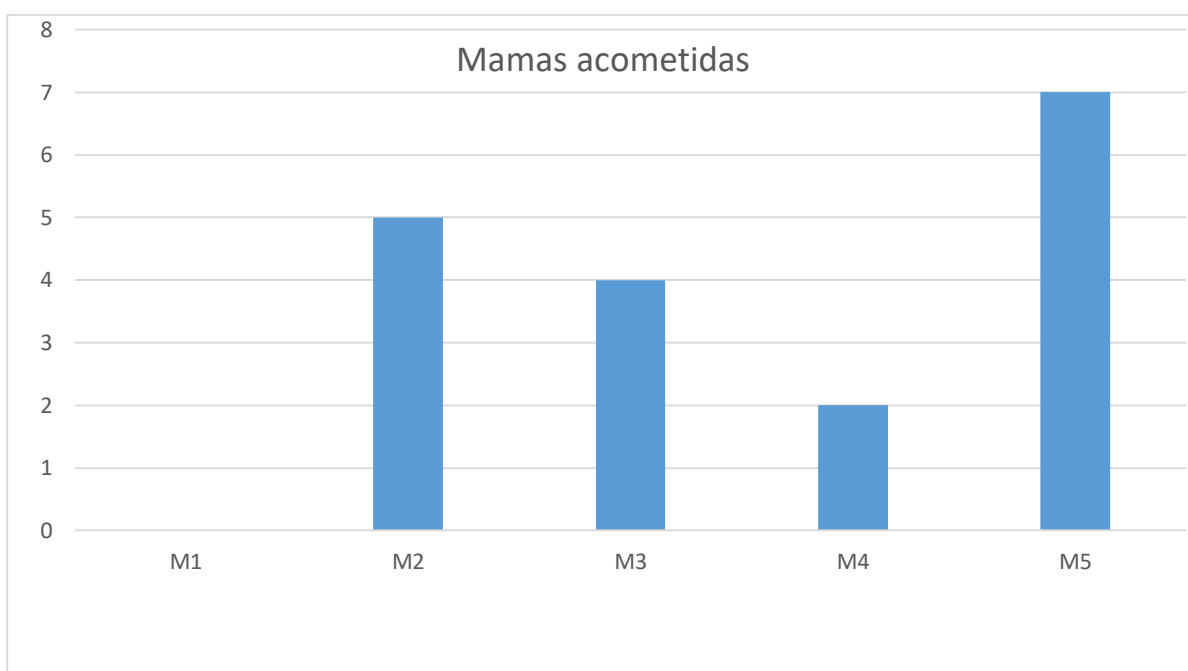


Figura 4 – Prevalência das mamas avaliadas no presente estudo. A mama caudal (M5) foi a mais acometida por neoplasmas mamários malignos, enquanto que nenhuma paciente teve a mama torácica cranial (M1) estudada neste experimento. UNESP/FCAV, 2020.

Nenhuma das pacientes estudadas apresentavam metástase pulmonar no momento da cirurgia. Este diagnóstico foi baseado na radiografia torácica em três projeções de cada paciente, realizada antes da cirurgia.

O tamanho dos neoplasmas foram variados, e as mensurações estabelecidas pelo patologistas no momento do histopatológico de cada paciente estão demonstradas na Tabela 1. A Figura 5 divide as cadelas em três grupos com diferentes intervalos de tamanho de tumor, de acordo com o estadiamento TNM preconizado por Rutteman et al. (2011).

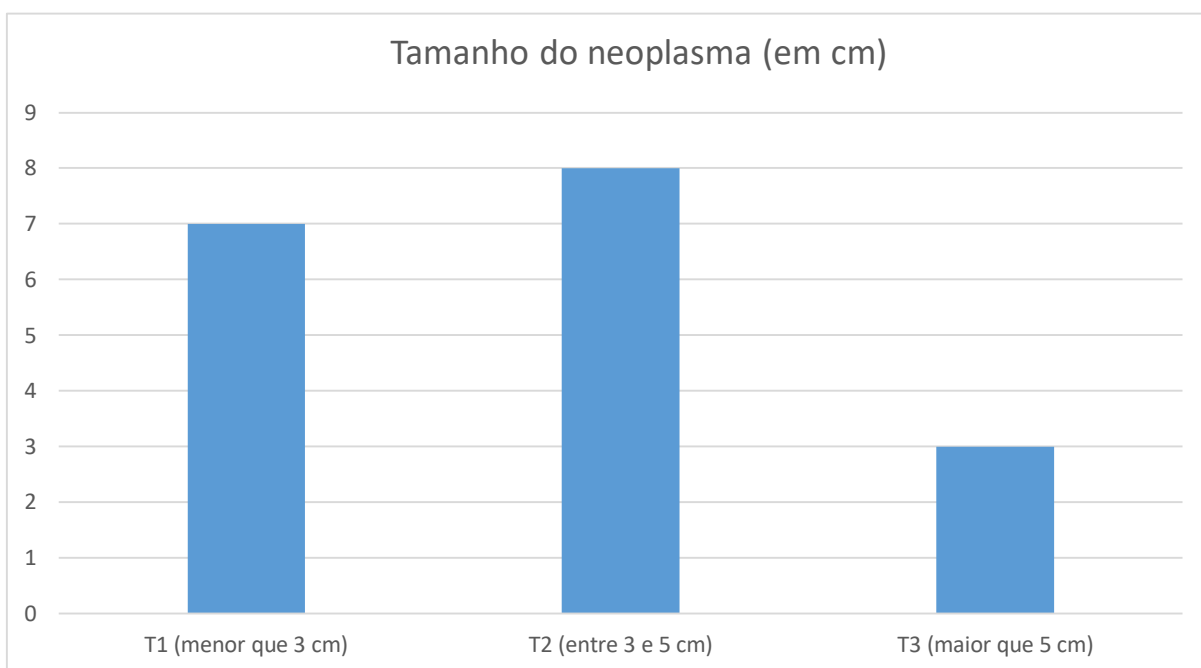


Figura 5 – Distribuição das cadelas participantes do experimento em três grupos, de acordo com o tamanho dos neoplasmas. A maioria das pacientes apresentaram tumores menores que 3 cm (7 pacientes) e entre 3 cm e 5 cm (8 pacientes). Apenas três pacientes apresentaram tumores maiores que 5 cm. UNESP/FCAV, 2020.

As cadelas foram distribuídas em dois grupos distintos, sendo eles: grupo contendo 10 pacientes com linfonodos livres de metástase e grupo contendo 8 pacientes com linfonodos metastáticos no laudo histopatológico. Na Tabela 1 são apresentados os tipos tumorais de cada paciente, bem como o tamanho do neoplasma, o status do linfonodo e sua imunomarcção para o marcador α -SMA.

Tabela 1 – Tipo histológico de todas as pacientes inclusas no estudo, bem como o status do respectivo linfonodo avaliado, tamanho do neoplasma, e intensidade da imunomarcagem na mama e no linfonodo, e sobrevida global da paciente (quando presente). UNESP, FCAV, 2020.

	TIPO HISTOLÓGICO	STATUS DO LINFONODO	TAMANHO DO NEOPLASMA (CM)	ESTADIAMENTO (TNM)	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA	SOBREVIDA GLOBAL (DIAS)
					MAMA	LINFONODO	
1	Carcinoma papilar grau II	Livre	1,8x1,0	Estádio I T1N0M0	+	-	-
2	Carcinoma em tumor misto grau I	Livre	1,2x1,1	Estádio I T1N0M0	++	-	-
3	Carcinoma de glândula apócrina tubopapilífero	Metastático	3,0x1,8	Estádio IV T2N1M0	++	++	-
4	Carcinoma papilar grau I	Metastático	6,5x4,5	Estádio IV T3N1M0	+++	+++	-
5	Carcinoma tubular grau I	Livre	1,8x1,0	Estádio I T1N0M0	+	+	1080

	TIPO HISTOLÓGICO	STATUS DO LINFONODO	TAMANHO DO NEOPLASMA (CM)	ESTADIAMENTO (TNM)	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA MAMA	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA LINFONODO	SOBREVIDA GLOBAL (DIAS)
6	Carcinoma micropapilar	Metastático	3,6x2,1	Estádio IV T2N1M0	+	+++	21
7	Adenomioepitelioma maligno	Livre	3,0x1,5	Estádio II T2N0M0	+++	-	1080
8	Carcinossarcoma	Livre	6,0x3,0	Estádio III T3N0M0	+++	+++	-
9	Carcinoma em tumor misto grau II	Livre	2,2x1,9	Estádio I T1N0M0	++	+++	0
10	Carcinoma tubular grau I	Livre	2,0x1,2	Estádio I T1N0M0	+	++	-
11	Adenomioepitelioma maligno	Metastático	4,8x4,2	Estádio IV T2N1M0	+++	+	240
12	Carcinoma micropapilar invasivo	Metastático	5,2x2,2	Estádio IV T3N1M0	+	++	600

	TIPO HISTOLÓGICO	STATUS DO LINFONODO	TAMANHO DO NEOPLASMA (CM)	ESTADIAMENTO (TNM)	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA MAMA	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO DE A-SMA LINFONODO	SOBREVIDA GLOBAL (DIAS)
13	Carcinoma em tumor misto grau II	Livre	0,5x0,2	Estádio I T1N0M0	-	++	-
14	Carcinoma sólido grau III	Metastático	3,0x1,5	Estádio IV T2N1M0	+++	+++	-
15	Carcinoma em tumor misto grau I	Livre	3,5x1,7	Estádio II T2N0M0	-	-	1020
16	Carcinoma micropapilar invasivo	Metastático	4,5x2,2	Estádio IV T2N1M0	++	+++	8
17	Adenomioepitelioma maligno	Metastático	3,5x1,6	Estádio IV T2N1M0	+++	+++	990
18	Carcinoma tubular grau I	Livre	2,7x0,8	Estádio I T1N0M0	+++	+	-

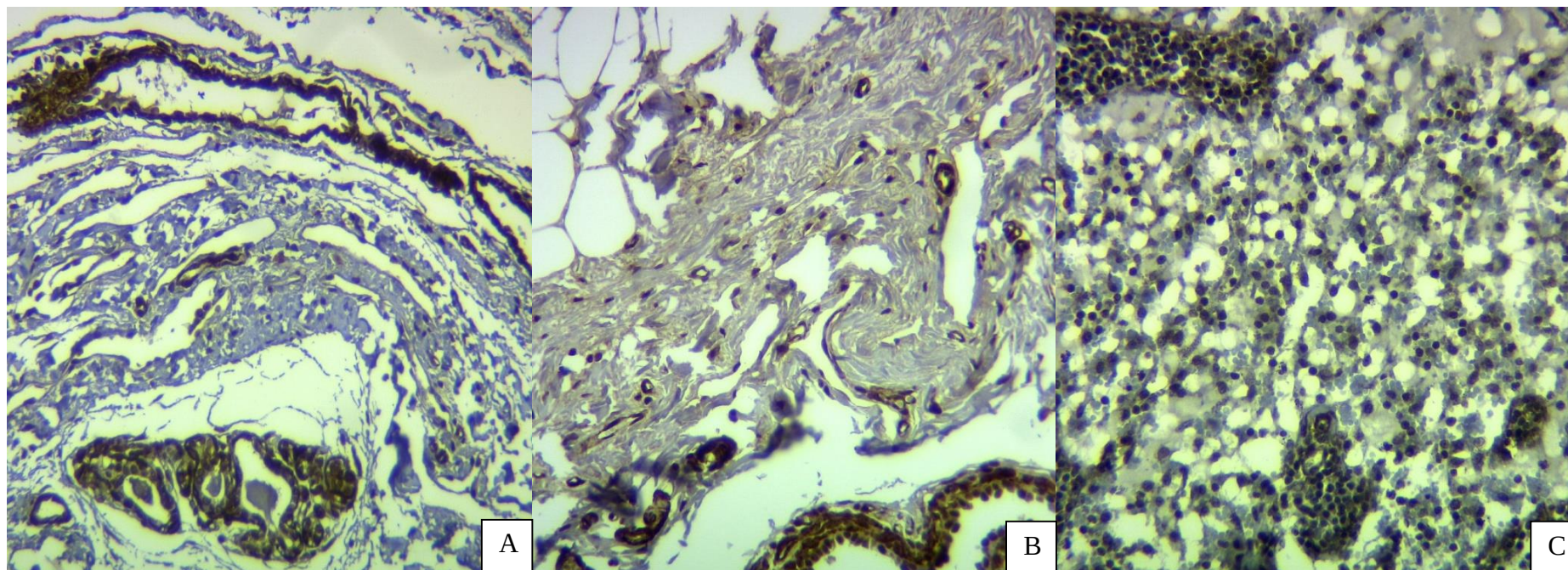


Figura 6 – Fotomicrografia de linfonodo de cão com imunomarcção (A) negativa (B) fraca, e (C) moderada para o marcador α -SMA, UNESP/FCAV, 2020. Aumento de 20x.

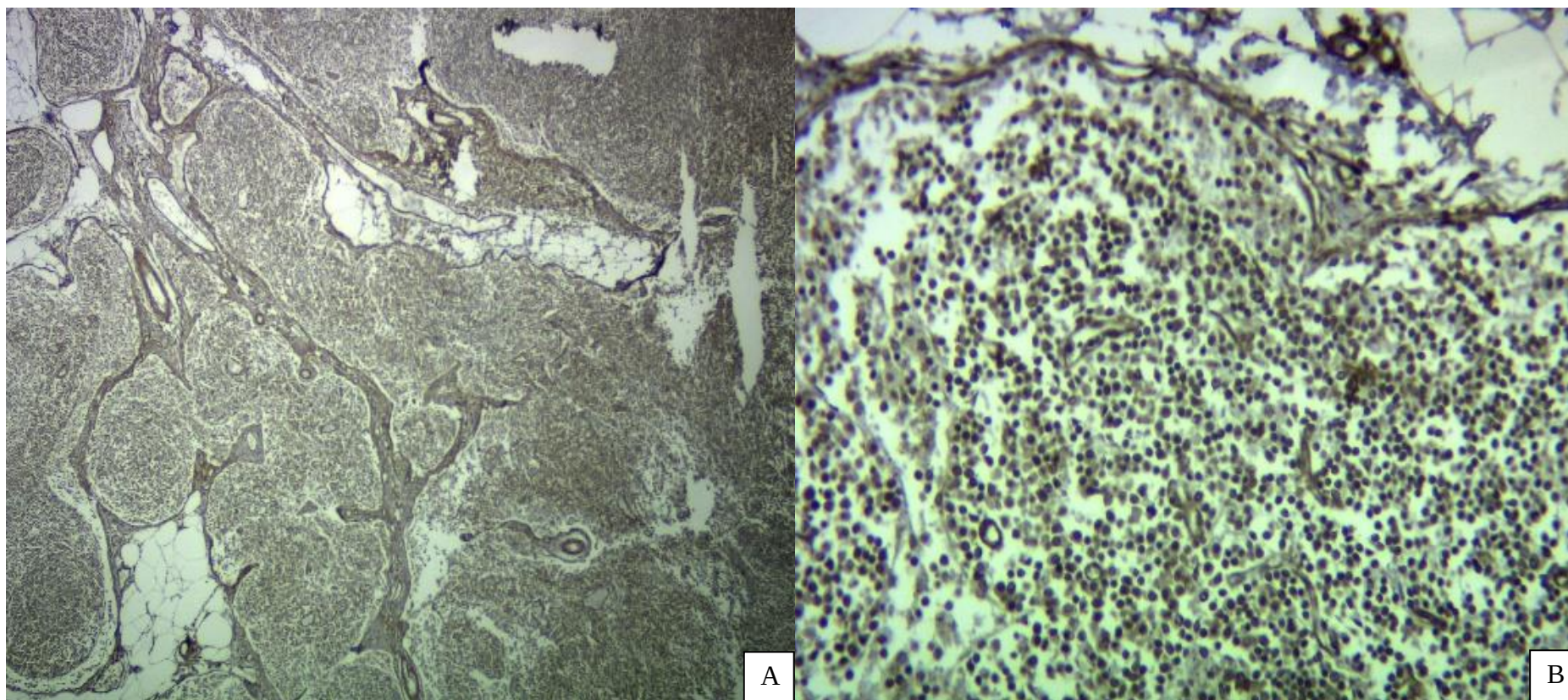


Figura 7 – Fotomicrografia de linfonodo de cão com imunomarcção fortemente positiva para o marcador α -SMA, UNESP/FCAV, 2020. (A) aumento de 4x. (B) aumento de 20x.

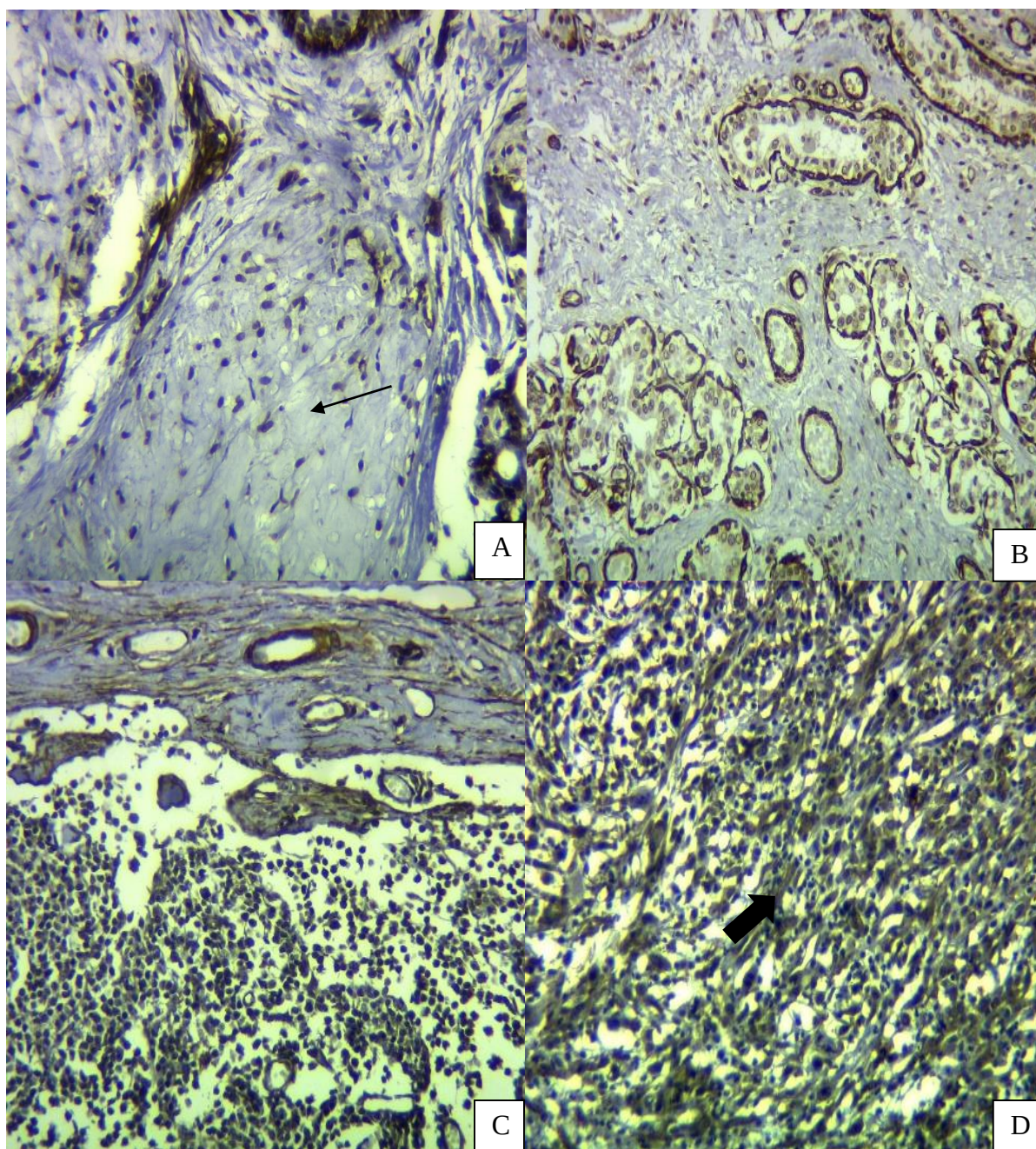


Figura 8 – Fotomicrografia de neoplasmas mamários apresentando imunomarcações com o anticorpo α -SMA, UNESP/FCAV, 2020. (A) negativa, (B) fraca, (C) moderada e (D) forte. Aumento de 20x. Seta fina: estroma tumoral com ausência de imunomarcação para α -SMA. Seta preenchida: estroma tumoral fortemente marcado para α -SMA.

Os resultados estatísticos encontrados neste trabalho apresentaram diferença significativa quanto às imunomarcações moderadas e fortes de α -SMA nos linfonodos, as quais foram associadas ao estadiamento IV da doença, ou seja, presença de metástase em linfonodo, sendo o valor $p = 0,03$ e grau de associação de 66%. Este resultado comprova que a presença de FACs nos linfonodos está relacionada com a presença de metástase.

A intensidade da marcação nas mamas estudadas não apresentou associação estatística com a imunomarcação de seu linfonodo correspondente ($p=1,00$), com estadiamentos IV ($p=0,57$) e com o tamanho do tumor (p -valor= 0,56). A idade das cadelas também não apresentou relação estatística com os estadiamento III e IV ($p=0,51$).

6. DISCUSSÃO

A presença de FACs nos linfonodos, independentemente do subtipo histológico dos neoplasmas mamários, apresentou 66% de grau de associação com metástases em linfonodos e valor $p = 0,03$. Um dos potenciais mecanismos de metástase para neoplasmas de origem epitelial tem sido atribuído à transição epitélio-mesenquimal (TEM), haja vista que neste processo ocorre a perda de adesão celular, a qual é uma importante característica de células epiteliais (Xing et al., 2010). Neste trabalho, a associação das imunomarcações moderadas e fortes de α -SMA nos linfonodos com o estadiamento IV da doença provavelmente se deve ao aumento de miofibroblastos em tecidos que passaram pela TEM. Assim, a maior intensidade da imunomarcação de α -SMA nos linfonodos metastáticos parece estar relacionada com a presença de células neoplásicas decorrentes deste processo.

O termo desmoplasia se refere às alterações no estroma tumoral, como a proliferação de fibroblastos, acompanhada de acúmulo de tecido conjuntivo (Micke e Ostman, 2004); e um dos métodos para avaliá-la é o uso de marcadores de miofibroblastos, como o anticorpo α -SMA (Nakayama et al., 2017). Portanto, a forte imunomarcação deste anticorpo no estroma tumoral de linfonodos metastáticos não

só mostra a presença de FAC, como também explica a alteração tecidual que ocorre no microambiente tumoral para permitir o desenvolvimento do câncer.

Mundim et al. (2016) sugerem que o linfonodo metastático apresenta um microambiente dinâmico que imita as condições do tumor primário, sinalizando o crescimento das células tumorais metastáticas. Entretanto, neste trabalho, o padrão de intensidade de imunomarcacão de α -SMA nos neoplasmas mamários não apresentou relação com o padrão de seu linfonodo correspondente.

O anticorpo α -SMA é considerado o principal imunomarcador de fibroblastos associados ao câncer, embora outros anticorpos possam ser utilizados em conjunto para identificar e caracterizar melhor o tecido neoplásico e correlacionar com seu comportamento (Mundim et al., 2016). Células epiteliais que passaram pelo processo de TEM in vitro adquiriram alguns marcadores de componentes mesenquimais (como α -SMA, vimentina, desmina e N-caderina) e perderam marcação comum a células epiteliais, como E-caderina (Marsh et al., 2013). A TEM pode ser acentuada pela degradação da MEC provocada pelas metaloproteinases (MMPs), as quais são produzidas em grande parte pelos FACs. O remodelamento da MEC causado pelas MMPs é fundamental para a progressão do neoplasma e alteração do microambiente tumoral (Xing et al., 2010).

Além disso, a inflamação que ocorre no tumor tem um papel importante na progressão do câncer, de forma que a avaliação dos receptores de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em conjunto com o α -SMA nos linfonodos metastáticos torna-se promissora em estudos futuros, haja vista que a expressão de COX-2 em FACs foi 6 vezes maior que em fibroblastos normais. Dessa forma, o estudo de tais marcadores em conjunto com α -SMA é interessante para ampliar o conhecimento do processo de TEM nos linfonodos metastáticos.

O risco de apresentar neoplasmas mamários aumenta com a idade, sendo mais frequentes em cadelas de 7 à 13 anos (Pastor et al., 2018; Bulman-Fleming, 2020). Neste trabalho, a maioria das pacientes seguiu este padrão, porém, duas pacientes apresentaram idade inferior a 7 anos (Figura 1). Alguns trabalhos relacionam as idades mais avançadas com tumores de mama de comportamento mais agressivos (Litterine-Kaufman et al., 2019); no entanto, no presente estudo não foi encontrada relação entre idade avançada (maior que 9 anos) e estadiamentos III ou IV.

Algumas raças citadas neste trabalho são consideradas raças de maior risco para o desenvolvimento de neoplasmas mamários, como York Shire, Poodle, Maltês, Labrador Retriever, Golden Retriever (Salas et al., 2015; Litterine-Kaufman et al., 2019; Bulman-Fleming, 2020). Apesar da raça mais predominantes neste experimento ser SRD, 66,7% dos pacientes corresponderam à pacientes de raça (Figura 2), o que vai de acordo com Pastor et al. (2018), que também obteve predomínio de animais de raça pura em seu trabalho. Entretanto, o predomínio das raças deste trabalho, bem como de cadelas SRD provavelmente se deve à variação das populações atendidas em diferentes regiões.

Embora seja mais comum as mamas caudais e inguinais (M4 e M5) apresentarem tumor de mama (Litterine-Kaufman et al., 2019), neste trabalho as mamas mais acometidas foram as torácicas caudais (M2) e mamas inguinais (M5), com 27,7% e 38,8% de representatividade, respectivamente. Algumas cadelas deste experimento apresentaram neoplasmas em outras mamas, mas foi escolhido para estudo apenas a mama com o neoplasma que apresentou laudo histológico de maior malignidade e seu linfonodo regional correspondente, já que a presença de múltiplas massas não parecem ser um indicador prognóstico negativo (Litterine-Kaufman et al., 2019).

Neste trabalho, os tumores maiores (estadiamento III) não tiveram relação com alta intensidade da imunomarcção de α -SMA. Yamashita et al. (2012) também não encontraram diferenças significativas em relação ao tamanho de tumores de mama em mulheres.

Tumores de mama invasivos apresentam miofibroblastos em proporção maior do que em carcinomas *in situ*; dessa forma, o ganho de actina de músculo liso pelos fibroblastos tumorais pode ser um pré-requisito para a invasividade tumoral e agressividade em carcinomas mamários (Micke e Ostman., 2004). A presença de reação desmoplásica e tumor rico em estroma está associado a pior prognóstico em tumor de mama (Folgueira et al., 2013). No entanto, neste estudo as imunomarcções moderadas/fortes nas mamas não foram estatisticamente relacionadas ao estadiamento IV da doença, embora alguns tumores conhecidos como altamente agressivos, como carcinossarcoma (paciente número 8) e carcinoma sólido grau 3 (paciente14) tiveram imunomarcção forte para o marcador α -SMA.

As imunomarcações de α -SMA fortes para os tipos histológicos carcinosarcoma (paciente número 8) e adenomioepitelioma maligno (pacientes números 7, 11 e 17) podem estar relacionada não apenas a agressividade tumoral, mas também ao componente mesenquimal presente nestes tumores, os quais contém naturalmente mais fibroblastos e, portanto, mais actina de musculo liso.

Apesar da pouca repetição de tipos histológicos neste trabalho, as três mamas com carcinoma micropapilar (pacientes números 6, 12 e 16), o qual é considerado um subtipo agressivo, tiveram baixa imunomarkação para α -SMA (Tabela 1). Dessa forma, pode-se sugerir que a obtenção da imunomarkação para α -SMA nos tecidos neoplásicos mamários não esteja diretamente relacionada com a agressividade tumoral e prognóstico, mas sim à uma alteração individual que ocorre em cada estroma tumoral.

Sendo assim, os resultados deste trabalho encorajam a ampliação do estudo de FACs em linfonodos metastáticos, com objetivo de contribuir para o melhor entendimento da participação dessas células na progressão tumoral, principalmente em metástases.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o tamanho tumoral não influencia nas intensidades de imunomarkação de α -SMA nas mamas. Além disso, não houve associação entre a intensidade de marcação nas mamas e seu linfonodo correspondente. No entanto, linfonodos metastáticos estão relacionados com a maior expressão de α -SMA. O microambiente tumoral é complexo e deve ser melhor explorado em novos estudos.

REFERÊNCIAS

- HAO Y, GUO X, MA B, ZHU, L, LIU L. (2016). Relationship between ultrasound elastography and myofibroblast distribution in breast cancer and its clinical significance. **Scientific Reports** 6:1-10. Doi: < <https://doi.org/10.1038/srep19584> >
- XING F, SAIDOU J, WATABE K . (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. **Frontiers in bioscience** 15:166-179. Doi: <<https://doi.org/10.2741/3613>>
- FRANCO OE, SHAW AK, STRAND DW, HAYWARD SW. (2010) Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 21: 33-39. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.10.010>>
- YOSHIMOTO S, HOSHINO Y, IZUMI Y, TAKAGI S. (2017) α -Smooth muscle actin expression in cancer associated fibroblasts in canine epithelial tumors. **Japanese Journal of Veterinary Research** 65:135-144. Doi: < <http://doi.org/10.14943/jjvr.65.3.135> >
- NIEMIEC J, ADAMCZYK A, HARAZIN-LECHOWSKA A, AMBICKA A, GRELA-WOJEWODA A, MAJCHRZYK K, KRUCZAK A, SAS-KORCZYŃSKA B, RYŚ J. (2018). Podoplanin-positive Cancer-associated Stromal Fibroblasts in Primary Tumor and Synchronous Lymph Node Metastases of HER2-overexpressing Breast Carcinomas. **Anticancer Research** 38:1957-1966. Doi: < <https://doi.org/10.21873/anticancer.12433> >
- MUNDIM FGL, PASINI FS, NONOGAKI S, ROCHA RM, SOARES FA, BRENTANI MM, LOGULLO AF. (2016). Breast Carcinoma-associated Fibroblasts Share Similar Biomarker Profiles in Matched Lymph Node Metastasis. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology** 24:712–720. Doi: < <https://doi.org/10.1097/pai.0000000000000253> >
- KASHIMA H, NOMA K, OHARA T, KATO T, KATSURA Y, KOMOTO S, SATO H, KATSUBE R, NINOMIYA T, TAZAWA H, SHIRAKAWA Y, FUJIWARA T. (2019). Cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote the lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer** 144: 828-840. Doi: < <https://doi.org/10.1002/ijc.31953> >
- SASAKI K, SUGAI T, ISHIDA K, OSAKABE M, AMANO H, KIMURA H, SAKURABA M, KASHIWA K, KOBAYASHI S. (2018). Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma. **Human Pathology** 79:1-8. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.006>>

GONDA TA, VARRO A, WANG TC, TYCKO B. (2010). Molecular Biology of câncer-associated fibroblastos: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? **Seminars in Cell & Developmental Biology** 21:2-10. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.10.001>>

FOLGUEIRA MAAK, MAISTRO S, KATAYAMA MLH, ROELA RA, MUNDIM FGL, NANOGAKI S, DE BOCK GH, BRENTANI MM. (2013). Markers of breast câncer stromal fibroblastos in the primary tumor site associated with limph node metastasis: a systematic review including our case series. **Bioscience Reports** 33:921-929. Doi: <<https://doi.org/10.1042/bsr20130060>>

AMORNSUPAK K, JAMJUNTRA P, WARNNISSORN M, O-CHAROENRAT P, SANGUANRAKSA D, THUWAJIT P, ECCLES SA, THUWAJIT C. (2017). High ASMA+ Fibroblasts and Low Cytoplasmic HMGB1+ Breast Cancer Cells Predict Poor Prognosis. **Clinical Breast Cancer** 17:441-452. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2017.04.007>>

NUNES FC, DAMASCENO KA, DE CAMPOS CB, BERTAGNOLLI AC, LAVALLE GE, CASSALI GD. (2019). Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Veterinary and Animal Science** 7:100039. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.09.003>>

MARSH T, PIETRAS K, MCALLISTER SS. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta** 1832:1070-1078. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.013>>

NEWMAN AC, NAKATSU MN, CHOU W, GERSHON PD, HUGHES CCW. (2011). The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. **Molecular Biology of the Cell** 22:3791-3800. Doi: <<https://doi.org/10.1091/mbc.e11-05-0393>>

FROMIGUÉ O, LOUIS K, DAYEM M, MILANINI J, PAGES G, TARTARE-DECKERT S, PONZIO G, HOFMAN P, BARBRY P, AUBERGER P, MARI, B. (2003). Gene expression profiling of normal human pulmonary fibroblasts following coculture with non-small-cell lung cancer cells reveals alterations related to matrix degradation, angiogenesis, cell growth and survival. **Oncogene** 22:8487-8497. Doi: <<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206918>>

RUTTEMAN G, WITHROW S, MACEWEN E. (2001). Tumors Of The Mammary Gland. In: Withrow S, Macewen E (Eds.) **Small Animal Clinical Oncology**. Wb Saunders: Philadelphia

MACPHAIL CM. (2017). Cirurgia dos Sistemas Reprodutivo e Genital. In.: Fossum TW (Eds.) **Cirurgia de Pequenos Animais**. St Louis: Mosby; p. 809-815.

ABDELMEGEED S, MOHAMMED S. (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters** 15:8195-8205. Doi: <<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>>

KARAYANNOPOULOU M, LAFIONIATI S. (2016). Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: A review of studies from 2000 to date. **Revue de Médecine Vétérinaire** 167:192-200.

BORECKA P, RATAJCZAK-WIELGOMAS K, CIAPUTA R, KANDEFER-GOLA M, JANUS I, PIOTROWSKA A, KMIECIK A, PODHORSKA-OKOLÓW M, DZIĘGIEL P, NOWAK M. (2020). "Expression of Periostin in Cancer-Associated Fibroblasts in Mammary Cancer in Female Dogs." **In Vivo** 34:1017–1026. Doi: <<https://doi.org/10.21873/invivo.11870> >

BULMAN-FLEMING J. (2020). Mammary Cancer. In: Bruyette DS. **Clinical Small Animal Internal Medicine**. Wiley-Blackwell.

RAMOS-VARA JA. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology** 42: 405-426. Doi: <<https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>>

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell** 144: 646-674. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>>

ARAÚJO MR, CAMPOS LC, FERREIRA E, CASSALI GD. (2015). Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:1360–1367. Doi: <<https://doi.org/10.1111/jvim.13576>>

LITTERINE-KAUFMAN J, CASALE AS, MOUSER PJ. (2019). Prevalence of malignancy in masses from the mammary gland region of dogs with single or multiple masses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 255: 817-820. Doi: < <https://doi.org/10.2460/javma.255.7.817>>

MICKE P, OSTMAN A. (2004). Tumour–stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? **Lung Cancer** 45: 163-175. Doi: < <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.07.977>>

PASTOR N, CABALLÉ NC, SANTELLA M, EZQUERRA LJ, TARAZONA R, DURAN E. (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. **Austral Journal of Veterinary Sciences**. 50:143-147. Doi: <<https://doi.org/10.4067/s0719-81322018000300143> >

YAMASHITA M, OGAWA T, ZHANG X, HANAMURA N, KASHIKURA Y, TAKAMURA M, YONEDA M, SHIRAISHI T. (2012) Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. **Breast Cancer**. 19:170–176. Doi: <<https://doi.org/10.1007/s12282-010-0234-5> >

SALAS Y, MÁRQUEZ A, DIAZ D, ROMERO L. (2015). Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **Plos One**. 10: e0127381. Doi: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>>

NAKAYAMA H, OHUCHIDA K, YOSHIDA M, MIYAZAKI T, TAKESUE S, ABE T, ENDO S, KOIKAWA K, OKUMURA T, MORIYAMA T, NAKATA K, MIYASAKA Y, SHIRAHANE K, MANABE T, OHTSUKA T, TOMA H, TOMINAGA Y, NAGAI E, MIZUMOTO K, ODA Y, NAKAMURA M. (2017). Degree of desmoplasia in metastatic lymph node lesions is associated with lesion size and poor prognosis in pancreatic cancer patients. **Oncology Letters.** 14:3141-3147. Doi: <<https://doi.org/10.3892/ol.2017.6549>>

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>> Acesso em: 01 de junho de 2020.