

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

**IMUNODETECÇÃO DE MARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE
GATAS – CORRELAÇÃO DOS PADRÕES DOS
CLASSIFICAÇÃO**

Augusto Schweigert

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2011

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

**IMUNODETECÇÃO DE MARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE
GATAS – CORRELAÇÃO DOS PADRÕES DOS
CLASSIFICAÇÃO**

Augusto Schweigert

Orientadora: Profa. Adjunto Gisele Fabrino Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AUGUSTO SCHWEIGERT – Clevelândia – PR, 12 de Agosto de 1986. Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade Integrado de Campo Mourão, Paraná em 2008. Residência em Patologia Animal pela Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, 2009, Presidente Prudente, São Paulo. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, São Paulo.

"Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é
dado."

J.R.R. Tolkien.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP, pelo Financiamento do projeto e pela bolsa concedida, fundamentais para realização do projeto de pesquisa.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa concedida no início do projeto.

Agradeço aos meus pais e familiares que mesmo de longe concederam apoio necessário para realização do projeto.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba pela estrutura física assim como apoio da coordenação e equipe do curso de pós-graduação pela solicitude.

Agradeço à Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado pela paciência, orientação, pelo exemplo, convivência, pelo conhecimento concedido durante o decorrer do programa, pelo auxílio na redação de trabalhos, pelas correções, e pelo companheirismo e dedicação ao projeto.

Agradeço à Professora Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto pelo apoio científico, pela companhia e por conceder estrutura física e microscopia para captura e análise de imagem, fundamentais para à avaliação dos resultados do projeto. E ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles pela estrutura física cedida durante a parte inicial do desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao Laboratório de Patologia Veterinária– VetPat de Campinas e ao Dr. Felipe Ruiz Sueiro pela disponibilidade, pelas amostras concedidas e utilizadas no projeto de pesquisa e pela contribuição técnica científica.

Agradeço a todos os amigos feitos durante o curso de pós-graduação, à cada conversa de corredor e a todos que através de pequenos momentos de atenção tornaram minha adaptação em Araçatuba mais agradável.

SUMÁRIO

1. Resumo	10
2. Abstract	11
3. INTRODUCAO	12
3.1 Anatomofisiologia da glândula mamária	13
3.2 Neoplasias mamárias em gatas – classificação	15
4. MARCADORES DE PRONGNÓSTICO	19
4.1 Matriz Metaloproteinase – 9	19
4.2 Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF	22
4.3 Proteína Ki67	25
4.4 Infiltrado Inflamatório	26
4.5 Objetivos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 Amostras	31
5.2 Imunoistoquímica	31
5.3 Análise de imagem	35
5.4 Análise estatística	35
6. RESULTADOS	36
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÕES	52
9. REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da drenagem linfática de gata. A- linfonodo axilar, B- vasos linfáticos que conectam as glândulas mamárias torácicas com o linfonodo axilar, C- diafragma, D - conexão linfática entre a glândula mamária abdominal caudal e a glândula mamária inguinal, E - Linfonodo inguinal superficial. A parte inferior da figura mostra a drenagem venosa. 1 – veia axilar, 2 – ramos da veia torácica interna penetrando o músculo peitoral, 3 – veia epigástrica cranial, 4 – veias intercostais. 5 – veia epigástrica caudal superficial.....**14**

Figura 2. Fotomicrografia de neoplasia mamaria em gata. A: Carcinoma Tubulopapilar. B: Carcinoma cribriforme. C: Carcinoma sólido de glândula mamária (HE – objetiva de 40 x. barra: 50 micrometros).....**34**

Figura 3. Fotomicrografia de diferentes marcadores de prognóstico em carcinoma cribriforme de glândula mamária em gatas. (40x. Método Steptoavidina-peroxidase, revelador DAB) A: marcação imuno-histoquímica Anti-MMP-9, intensa marcação intracitoplasmática. B: intensa marcação intranuclear e intracitoplasmática Anti – VEGF-A, moderada marcação intersticial. C: Imunomarcação intensa intranuclear bem delimitada Anti-KI-67.....**38**

Figura 4. Fotomicrografia de diferentes marcadores de prognóstico em carcinoma cribriforme de glândula mamária em gatas. (Objetiva de 40x. Método Steptoavidina-peroxidase, revelador DAB) A: marcação imunoistoquímica Anti-CD3, intensa marcação intracitoplasmática. B: intensa marcação intracitoplasmática Anti - CD79. C: Imunomarcação intensa intracitoplasmática Anti-MAC382.....**39**

Figura 5. Porcentagem de área imunomarcada para a MMP-9. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas, a e b diferem se entre si.....**40**

Figura 6. Porcentagem de área imunomarcada para a VEGF – A. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.....**40**

Figura 7. Porcentagem de área imunomarcada para a proteína Ki-67. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.....**41**

Figura 8. Porcentagem de área imunomarcada por células TCD3+, a e b diferem-se entre si. A: Porcentagem de área imunomarcada por linfócitos TCD3 nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.....**41**

Figura 9. Porcentagem de área imunomarcada pelo infiltrado inflamatório de linfócitos B CD79+ . A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.....**42**

Figura 10. Porcentagem de área imunomarcada por macrófagos marcados pelo Anti-MAC382. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.....**42**

Figura 11. Correlação entre a imunomarcção entre alguns marcadores detectados por imunoistoquímica nos tumores mamários em gatas. A: correlação entre a expressão protéica entre MMP-9 e Ki67. B: correlação entre a expressão protéica da MMP-9 e Linfócitos TCD3+. C: correlação entre a expressão da proteína Ki67 e células TCD3+.....**43**

Figura 12. Porcentagem de amostras graduadas em graus I, II e III, nas diferentes classificações morfológicas dos tumores de mama em gatas.....**44**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de graduação histológica dos tumores segundo Elston e Elis (1998).....**18**

Tabela 2. Anticorpos, clones, diluição e tampão de recuperação antigênica utilizados nas reações de imunoistoquímica.....**33**

1. Resumo

As neoplasias mamárias em gatas representam o terceiro tipo neoplásico mais frequente nesta espécie. A maioria destas neoplasias são malignas, e exibem alto potencial metastático. Devido a isto, e a escassez de trabalhos referentes ao prognóstico de gatas com câncer de mama, foram avaliados em 32 amostras de neoplasia mamária de gatas, a expressão imuno-histoquímica de alguns marcadores de prognóstico. As amostras foram segregadas em grupos seguindo os parâmetros de classificação da organização mundial de saúde em carcinomas tubulopapilares, cribriformes e sólidos e de acordo com o método de Nottighan modificado em graus I, II e III. Os cortes histológicos foram submetidos a processamento imuno-histoquímico para avaliação da expressão da metaloproteinase 9 (MMP-9), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), da proteína de proliferação celular Ki-67 e de linfócitos TCD3+, CD79+ e macrófagos, afim de se avaliar os diferentes padrões de classificação. Os resultados da marcação imuno-histoquímica foram avaliados com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada para determinar a porcentagem da área imunomarcada. Em relação à classificação morfológica observou-se diferença significativa entre a densidade de linfócitos TCD3+ entre os grupos. Durante a análise nas amostras segregadas de acordo com a gradação histológica verificou-se diferença significativa entre a imunomarcação da MMP-9, entre a intensidade de infiltração de células TCD3+ e uma tendência de variação na proteína Ki-67. Observamos também correlação positiva entre os níveis de expressão da MMP-9 e da Ki-67, da MMP-9 e células TCD3, e da proteína Ki-67 com as células TCD3. Desta forma concluímos que classificação histológica dos carcinomas de mama em gatas não é um bom parâmetro para determinação do prognóstico da doença, quando avaliada junto com os níveis de expressão imuno-histoquímica da MMP-9, do VEGF e da Ki67. Os melhores parâmetros para a determinação do prognóstico foram observados nas neoplasias agrupadas pela gradação histológica. Neste caso, quanto maior o índice proliferativo determinado pela positividade da proteína Ki-67 das células neoplásicas, maiores são as taxas de degradação da matriz extracelular (aumento da marcação para MMP-9), assim como maior o numero de células CD3+ presentes no tecido. O VEGF, os linfócitos B e macrófagos não foram bons marcadores de prognostico para as neoplasias mamarias em gatas.

Palavras-chave: Câncer, felinos, metaloproteinase 9, imunoistoquímica.

2. Abstract

The mammary tumors in cats represent the third most common tumor type in the species. Most of these are malignant neoplasms exhibit a high metastatic potential. Because of this and the lack of studies regarding the prognosis for cats with breast cancer were evaluated 32 samples of breast cancer in cats. These samples were grouped according to morphological and histological classification, and the sections were submitted to immunohistochemical processing to evaluate the expression of metalloproteinase 9 (MMP-9), the vascular endothelial growth factor (VEGF) protein of cell proliferation Ki-67 and CD3 + T lymphocytes, and CD79 + macrophages in order to evaluate differences in the different grading standards. The results of immunohistochemical marking were evaluated by using a system of computerized image analysis to assess the percentage of area immunomarked. Regarding the morphological classification showed a significant difference between the amount of T lymphocytes CD3 + between the groups. During analysis the samples segregated according to histologic grading there was significant difference between the immunostaining of MMP-9, between the intensity of infiltration of T cells CD3 + and a tendency of variation in the Ki-67 protein. We also observed a positive correlation between the expression levels of MMP-9 and Ki-67, MMP-9 and TCD3 cells, and Ki-67 protein in cells T CD3+. Thus we conclude that histologic classification of breast carcinomas in cats is not a good parameter for determining the prognosis of the disease when evaluated together with the levels of immunohistochemical expression of MMP-9, VEGF and Ki67. The best parameters for determining the prognosis was observed when the histological grade was considered. The higher was the proliferative index determined by the positivity of Ki-67 protein from neoplastic cells, the greater the rate of degradation of extracellular matrix (increased labeling for MMP-9), as well as increased the number of CD3 + cells present in the tissue. VEGF, B lymphocytes and macrophages were not good markers of prognosis in mammary cancer in cats.

Keywords: Cancer, felines, metalloproteinase 9, immunohistochemistry.

3. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) descreve que nos últimos 50 anos a população de idosos no Brasil passou de três para 17 milhões, ou seja, cerca de 650 mil idosos são incorporados à população brasileira por ano. Na população animal não é diferente. Os avanços no combate e prevenção de doenças infecciosas têm aumentado a expectativa de vida dos animais, e com isso, observa-se um aumento da ocorrência de doenças relacionada à idade, como por exemplo, o câncer (WHO, 2011).

A população de gatos nos EUA é estimada em 90.000.000, enquanto que os cães respondem por aproximadamente 73.000.000 de animais nos lares americanos. O Brasil tem 32 milhões de cães e 16 milhões de gatos, e em cidades como Porto Alegre, Curitiba e Campinas 50% dos lares possuem gatos como animal de estimação.

A elevada incidência de tumores de mama em animais de companhia faz com que pesquisas neste tema aumentem em relação a outras afecções (PELETEIRO, 1994). Nas últimas décadas houve um interesse considerável pelos pesquisadores em estudar os tumores mamários em cães e gatos. Isto em função da semelhança em diversos aspectos com os tumores de mama da mulher e também pela alta frequência desta doença na rotina clínica dos animais de companhia (SILVA et al., 2004).

As neoplasias de cães e gatos são modelos apropriados, e válidos, ao estudo da biologia do câncer, assim como para investigar a ação de agentes terapêuticos, já que os animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (MACEWEN, 1990; PANG e ARGYLE, 2009). A oncologia comparativa surgiu recentemente como uma disciplina que integra os cânceres de ocorrência natural em animais com estudos gerais sobre a biologia do câncer (PAOLONI e KHANNA, 2007).

3.1 Anatomofisiologia da glândula mamária

A glândula mamaria é classificada como uma glândula apócrina com diversas ramificações complexas de células produtoras de leite. As glândulas ficam localizadas na pele da parede ventral do tórax e abdômen em posição paramediana aos membros torácicos e pélvicos. A gata possui quatro pares de glândulas mamárias, dispostas bilateralmente em duas fileiras simétricas que se estendem da região torácica ventral até a abdominal ventral. Estas mamas são denominadas de axilares, torácicas, abdominais e inguinais (SCHWARZE e SCHRÖDER, 1972).

O sistema circulatório que supre o sistema mamário da gata é dividido em contingente arterial, venoso e linfático. Na circulação arterial o suprimento sanguíneo é realizado pelas artérias intercostais, os ramos cutâneos da artéria torácica externa e interna, artéria torácica lateral, artéria pudenda externa, artéria epigástrica superficial, artéria intercostal caudal e artéria circunflexa ilíaca profunda (CUNNINGHAM, 2004).

A drenagem venosa é realizada pelas veias axilares, dos ramos das veias torácicas internas que penetram os músculos peitorais, as veias epigástrica superficial cranial, veias intercostais e veia epigástrica superficial caudal. Algumas pequenas veias podem cruzar a linha média e penetrar a parede torácica, servindo como vias de disseminação de êmbolos de tumores mamários. O sistema linfático é constituído pelos linfonodos inguinais superficiais, externos craniais, axilares e externos (Figura 1) (JOHNSTON et al., 2001; SCHWARZE e SCHORDER, 1972). Este extenso aparato linfático permite o correto funcionamento da atividade fisiológica das glândulas e permite também a disseminação de células tumorais para os pulmões gerando metástases, que são principal causa de morte das neoplasias mamárias de gatas (RUTTEMAN et al., 2001).

A drenagem linfática ocorre normalmente para os linfonodos e não há drenagem para a glândula contralateral ou linfonodo na glândula mamária normal. Na presença de neoplasia, o fluxo linfático pode estar alterado e pode ocorrer metástases por via retrógrada por meio do plexo linfático ou linfonodos poplíteos (SORENMO et al., 2011).

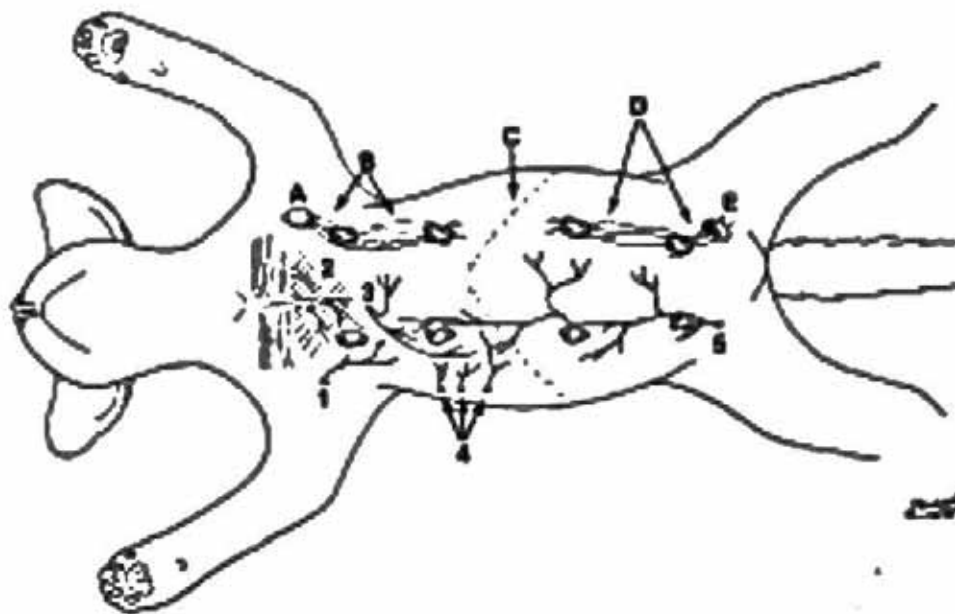


Figura1. Esquema da drenagem linfática de gata. A- linfonodo axilar, B- vasos linfáticos que conectam as glândulas mamárias torácicas com o linfonodo axilar, C- diafragma, D - conexão linfática entre a glândula mamária abdominal caudal e a glândula mamária inguinal, E - Linfonodo inguinal superficial. A parte inferior da figura mostra a drenagem venosa. 1 – veia axilar, 2 – ramos da veia torácica interna penetrando o músculo peitoral, 3 – veia epigástrica cranial, 4 – veias intercostais. 5 – veia epigástrica caudal superficial. (Fonte: JOHNSTON, et al., 2001).

3.2 Neoplasias mamárias em gatas – classificação

Histologicamente 85% a 93% dos tumores mamários felinos são malignos. Macroscopicamente, a maioria destes tumores apresenta comportamento invasivo, são geralmente aderidos à pele e ulcerados, com a presença de variados tipos de secreção e exsudato. Estes tumores apresentam-se ainda como nódulos firmes, únicos ou múltiplos, onde a inflamação pode estar evidente. Necrose e fistulação da massa também são características comuns dos tumores mamários em gatas (RUTTEMAN et al. 2001; WITHROW e MACEVEN, 2007).

A classificação histológica das neoplasias mamárias não é muito variada na gata, sendo os tipos mais comuns os carcinomas dos tipos tubular, sólido e papilar, diferente das cadelas que apresentam uma maior complexidade na classificação (PREZIOSI et al., 2002). As neoplasias mamárias das gatas são classificadas histologicamente de acordo com o grau de diferenciação celular, organização e pleomorfismo. As classificações histológicas propostas por Misdorp et al. (1999) da Organização Mundial de Saúde (OMS) que é a o método mais complexo, segrega os carcinomas de glândula mamária em gatas em carcinoma *in situ* não infiltrativo, carcinoma tubulopapilar, carcinoma cribriforme e carcinoma sólido. Outras variações sugeridas pelos mesmos autores são o carcinoma de células escamosas em glândula mamária, carcinoma mucinoso, carcinosarcoma e carcinoma ou sarcoma em tumor benigno.

O carcinoma *in situ* é caracterizado por uma proliferação celular maligna sem áreas de invasão, portanto com manutenção estrutural da membrana basal. Caracteriza-se ainda por apresentar espessamento tubular e ductal e eventualmente formar cistos na estrutura mamária. O arranjo neoplásico nesta classificação, semelhante aos outros carcinomas mamários, pode agregar diversos tipos distintos de proliferação celular, com distribuição sólida, tubulopapilar, cribriforme, e ainda podem ser vistas áreas de necrose, proliferação mixóide, além de outras estruturas presentes normalmente na glândula mamária. No carcinoma sólido de glândula mamária observa-se células formando cordões, ninhos sólidos com pouca quantidade de estroma de

sustentação e mais características celulares de indiferenciação. Este tipo é usualmente encontrada em cães e também em gatos (MISDORP et al., 1999).

O carcinoma tubulopapilar caracteriza-se por arranjo celular neoplásico formando túbulos e projeções papilares. Esta classificação pode ser subdividida em duas categorias: carcinoma tubular ou papilar por meio da observação do predomínio da formação neoplásica em túbulos ou em papilas. Em gatas, uma variação da classificação tubulopapilar é chamada de carcinoma cribriforme onde se observa a proliferação celular de maior malignidade e índice proliferativo, com a formação de grandes vacuolizações intercelulares (MISDORP et al., 1999) (FIGURA 2).

Dentre as lesões benignas de glândula mamária em gatas pode-se citar os adenomas simples, os fibroadenomas, hiperplasias não inflamatórias, como a hiperplasia ductotubular e hiperplasia fibroepitelial, sendo que estas não ultrapassam 15% das lesões encontradas em glândula mamária felina (WITHROW e MACEVEN, 2007).

As neoplasias mamárias malignas em gatas possuem ainda alto potencial metastático, e uma grande parte dos animais apresentam ao menos um foco de metástase no momento do óbito. O pulmão é o órgão de eleição para a implantação de metástases, causando insuficiência respiratória associada à carcinomatose pleural com efusão (WITHROW e MACEVEN, 2007).

Na classificação histológica, proposta pela OMS, pode-se ainda fazer a gradação histológica da neoplasia, seguindo critérios de organização e malignidade nuclear. Tal gradação é frequentemente utilizada na tentativa de estabelecer um prognóstico mais acurado ao paciente com câncer, por meio de características de agressividade tumoral. A gradação histológica comumente utilizada na medicina humana é o método de Nottingham modificado por Elston e Elis (1998), que substituiu métodos subjetivos de avaliação geral da massa (CASSALI et al., 2010).

Este sistema considera o índice de formação tubular da massa, as características de pleomorfismo nuclear e o índice mitótico da amostra, atribuindo pontuação de um a três para cada item, cuja somatória aloca o tumor em grau I, II ou III, em ordem crescente de anaplasia (Tabela 1). Sendo que amostras que recebem somatória de pontuação entre 3 – 5 são

classificadas em grau I, de 6 – 7 pontos em grau II e 8 – 9 pontos em grau III. Os graus são atribuídos em ordem crescente de anaplasia e são considerados como um indicador independente de prognóstico no paciente com câncer (CASSALI et al., 2011).

O uso do método de Nottingham modificado vem aumentando em medicina veterinária (NIETO et al., 2003; DUTRA et al., 2004; CAVALCANTI e CASSALI, 2006;) e mostra-se como uma ferramenta criteriosa, prática, econômica, e que correlaciona-se com outros fatores de prognóstico (CASSALI et al., 2011).

Tabela 1 – Sistema de gradação histológica dos tumores segundo Elston e Elis (1998) Adaptado (CASSALI, 2010).

Índice de formação tubular	Pleomorfismo Nuclear	Índice mitótico	Pontuação
> 75% do tumor	Semelhante ao normal	0 a 8 mitoses/10 campos	1
10 a 75% do tumor	Moderado aumento e variabilidade	9 a 16 mitoses / 10 campos	2
< 10% do tumor	Grande variação	17 ou mais mitoses / 10 campos	3

Adaptado (CASSALI et al., 2011)

4. MARCADORES DE PROGNÓSTICO

As células neoplásicas apresentam algumas características biológicas que conferem a estas, mecanismos que permitem o crescimento e a invasão tumoral. Tais características podem ser avaliadas pela expressão imuno-histoquímica de proteínas que regulam estes processos, ou seja, a avaliação de marcadores de prognóstico. A identificação, assim como a descoberta de novos marcadores tumorais pode ser valiosa para o acompanhamento do paciente oncológico (HAO, 2007).

Diversas são as ferramentas que podem ser utilizadas para se prever o prognóstico do paciente com câncer. Além dos métodos de classificação, propostos pela OMS, e do Método Nottingham modificado por Elston e Elis (1998), outros indicadores de prognóstico estão sendo profundamente investigados (FERREIRA et al., 2009), como marcadores de proliferação celular, (HERSHEY et al., 2005; HUOVINEN et al., 2011), elementos de vascularização (MILLANTA et al., 2002; DVORAK et al., 2011) inflamação (VANHERBERGHEN et al., 2009; WANG et al., 2011) e componentes da matriz extracelular, como as metaloproteinases (MMPs) (ARESU et al., 2011; RANOGAJEC et al., 2011).

4.1 Metaloproteinase da matriz – 9 (MMP-9)

Uma das maiores preocupações frente aos pacientes com câncer são as formações de metástases, processo que ocorre não de forma aleatória, e sim de forma ativa, envolvendo diversos mecanismos celulares. Esta interação entre células e o estroma é condição fundamental para o crescimento e progressão tumoral, este processo envolve fatores de crescimento, moléculas de adesão, estímulos angiogênicos, fatores de coagulação e ação de proteinases (AZNAVOORIAN et al., 1993; CURRAN e MURRAY, 2000).

As MMPs são endopeptidases da família das proteinases, cuja ativação ocorre no espaço extracelular. Sua secreção e consequente ativação ocorrem em diversos fenômenos fisiológicos normais, porém podem participar de forma

desordenada causando ou facilitando a progressão de doenças (RUNDHAUG, 2005).

São classificadas como MMPs apenas enzimas capazes de degradar fibras colágenas, colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Existem atualmente identificadas cerca de 20 tipos diferentes de MMPs, porém novos membros desta família ainda estão sendo identificados (KLEIN e BISCHOFF, 2011).

Diferentes células são capazes de produzir MMPs, dentre elas os neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e diversas células neoplásicas como as que compõe os meningiomas (MANDARA et al., 2009), tumores prostáticos (CHEN, 1999) e os carcinomas de glândula mamária (JOBIM et al., 2008).

As MMPs possuem a capacidade de digestão das proteínas que compõe a matriz extracelular e a membrana basal, como a fibronectina, elastina e colágeno, que atuam formando uma barreira natural para as células, organizando a sua proliferação, impedindo que estas ultrapassem barreiras e eventualmente ultrapassem os limites vasculares (VISSE, 2003). A MMP-9, também conhecida como gelatinase B, possui papel fundamental de interação com a membrana basal pela degradação do colágeno tipo IV. A sua expressão é importante em todos os estágios do câncer de mama (JOBIM, 2008), logo, uma superprodução de MMP-9 pode atuar de forma a facilitar invasão celular e a consequente origem de metástase. Além da degradação do colágeno do tipo IV, a MMP-9 possui a capacidade de degradação do colágeno do tipo V, XI e XVI (VISSE e NAGASE, 2003).

No câncer, os níveis de MMPs podem estar anormalmente elevados, possibilitando a invasão de células do tumor na matriz extracelular e gerar metástases em locais distantes do tumor primário. De fato, níveis elevados de MMPs estão associados com pior prognóstico em pacientes com câncer (STETLER-STEVENSON et al., 1993).

A ativação da transcrição de MMPs envolve diversos mecanismos complexos. De acordo com Curran et. al. (2000) algumas substâncias são responsáveis pelo estímulo da produção de MMPs. Dentre elas estão a interleucina 1, o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de necrose tumoral. Células expostas a estas

substâncias, podem mostrar uma maior produção de MMPs (KOSSAKOWSKA et al., 1999).

As citocinas possuem papel fundamental no estímulo de transição de MMPs e inibição pós transicional. De maneira geral, sabe-se que as IL – 1 e IL – 6 estimulam algumas MMPs, já as IL – 4 e IL – 10 inibem a função delas. Existem ainda os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) cujos mecanismos regulatórios envolvem citocinas e são estimulados pelas MMPs produzidas pela própria célula (KOSSAKOWSKA et al., 1999; KOIVUNEN et al., 1999). Atualmente sabe-se que existem quatro tipos de TIMPs e que estes formam o principal mecanismo fisiológico de inibição de MMPs. Desta forma, os TIMPs possuem papel fundamental no controle da proteólise (CHEN e WANG, 1999).

Existem diversos outros inibidores que podem bloquear a transcrição das MMPs, dentre eles estão os glicocorticóides, os hormônios da tireóide, os retinóides derivados de vitamina A, a progesterona e os andrógenos. Apesar de ocorrerem mecanismos sofisticados de transição e inibição da MMPs, fatores pós-transição devem também ser considerados, pois, por intermédio destes é possível controlar a atividade das MMPs (VINCENTI et al., 1996; SUN et al., 1999). Na fase pós transcrição, pode ocorrer a inibição de atividade das MMPs, principalmente pela ação das TIMPs (SCHROEN e BRINCKERHOFF, 1996).

É evidente o papel das MMPs na progressão tumoral e metástase, PELA degradação da matriz extracelular, devido a capacidade proteolítica destas enzimas. Por isto, inibidores potenciais de MMPs foram estudados, afim de serem utilizados como potenciais drogas antitumorais (CURRAN e MURRAY, 2000).

Um dos primeiros agentes inibidores de MMPs foram os hidroximatos. Estes atuam como quelantes de zinco, inibindo assim os sítios ativos das enzimas, inibindo sua função. Este inibidor sintético de metaloproteinases mostrou-se efetivo para inibição do crescimento e metástase em modelos animais, porém sua grande insolubilidade em água impede o uso intravenoso desta substância, já o seu uso em por via intraperitoneal, pode ser efetivo como adjuvante no tratamento de neoplasias cavitárias (WYLEI et al., 1999).

Koivunen et. al. (1999), em estudo utilizando peptídeos sintéticos de MMPs, observaram maior sobrevida em modelos experimentais de câncer em animais. Tais peptídeos impedem a migração de células endoteliais vasculares e neoplásicas impedindo assim a proliferação e a metástase tumorais. Desta forma, estes peptídeos podem ser utilizados como adjuvantes na terapia do câncer.

Outra classe de drogas utilizadas são as briostatinas, que são lactonas macrolídeas que atuam de forma a ativar a proteinase K e inibir a proliferação de células endoteliais, impedindo que ocorra angiogênese e impedindo os mecanismos de progressão tumoral (GATTO et al., 1999).

Diversos estudos ainda estão sendo realizados sobre o papel das MMPs e inibidores destas, no entanto, permanece o desafio de tornar esta classe de proteínas uma ferramenta clinicamente útil. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos de regulação da expressão das MMPs e da atividade destas enzimas são de grande importância, pelo seu elevado potencial de aplicações terapêuticas porque podem auxiliar a compreensão dos mecanismos de invasão tumoral e metástase. Sabe-se ainda que o aumento dos níveis de expressão da MMP-9 está relacionado com aumento da liberação de fatores estimulantes de secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (SCORILAS et al., 2001).

4.2 Fator de crescimento endotelial vascular - VEGF

O VEGF é um potente fator mitogênico para as células endotélio vascular. Ele produz uma rápida e completa resposta que causa angiogênese e aumento da permeabilidade capilar. Este fator é produzido e secretado por uma série de células normais, e possui secreção aumentada em células tumorais, incluindo células do câncer de mama (BOUDREAU e MEYERS, 2003).

O crescimento neoplásico e a formação de metástase são eventos ativos e que fundamentalmente dependem da neovascularização. Os mesmos relacionam-se intimamente com a secreção celular de VEGFs (LOHELA, et. al. 2009).

A formação de novos vasos envolve dois processos básicos: a vasculogênese, que é a diferenciação de células endoteliais, e a angiogênese,

que é a formação dos novos vasos propriamente dita. Tais processos ocorrem em resposta a diversos estímulos, mediados principalmente por fatores de crescimento (RISAU e FLAME, 1995; NAGY et al., 2009).

Existem diversos VEGFs e diferentes receptores, e estes participam de processos fundamentais, regulando a vasculogênese, a angiogênese e a linfangiogênese. Estas proteínas exercem função por sua ligação aos receptores de tirosina quinase. De forma básica, os VEGFs se ligam aos receptores de tirosina quinase VEGFR- 1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Os subtipos de fatores de crescimento vascular exercem diferentes funções (OLSSON et al., 2006; KARPANEN et al., 2008).

Os quatro subtipos de VEGFs descritos são: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D (BOUDREAU e MAYERS, 2003). O VEGF-A se liga ao VEGFR- 1 e VEGFR-2, induzindo angiogênese. Já o VEGF – C e VEGF – D estimulam a linfangiogênese. Existe ainda o VEGF – B, que possui ação cardíaca, causando hipertrofia e angiogênese coronariana (KARPANEN et al., 2008; BRY et al., 2010). No entanto, em alguns estudos demonstra-se que células tumorais apresentam maior secreção de VEGF-A, atuando nos receptores VEGFR- 1 e VEGFR-2 de forma a estimular a formação de novos vasos (LOCOPO et al., 1998; BOS et al., 2001; LOHELA et al., 2009).

Em trabalhos realizados com amostras de tecido mamário neoplásico de seres humanos, relata-se que o crescimento destes dependem da liberação de fatores de crescimento e formação de novos vasos ao redor do tumor (MAEDA et al., 1998; GASPARINI, 2000).

Vários fatores contribuem para o aumento da expressão do VEGF no câncer de mama. A baixa concentração de oxigênio intracelular bloqueia a degradação do fator indutor da hipóxia (HIF-1a), o que determina a hipóxia intracelular, que, por sua vez, determina o aumento da atividade angiogênica pela ativação da transcrição do gene VEGF (BOUDREAU e MAYERS, 2003).

Além da liberação e produção de VEGF pelas células tumorais, acredita-se que a interação entre células epiteliais neoplásicas com células do endotélio vascular possam aumentar a produção de VEGF. As células endoteliais também seriam responsáveis pelo aumento de produção desta substância por efeito parácrino, permitindo com que estas promovam o crescimento tumoral, por meio da angiogênese por estímulo próprio (CHUNG et al., 1996).

Outra condição para o aumento da expressão de VEGF é o aumento da expressão de metaloproteinases da matriz, entre elas o aumento da expressão celular de MMP-9 causa degradação de membrana basal e estimula liberação de fatores estimulantes de secreção de VEGF (SCORILAS, et. al. 2001).

Autores demonstram ainda que alterações de expressão das integrinas que promovem interação de células epiteliais com a membrana basal, assim como outros marcadores de proliferação celular estão relacionados com maior liberação de VEGF, ocasionando um maior índice de proliferação vascular (CHUNG et al., 2002).

Apesar do VEGF ser apontado como principal agente estimulador de angiogênese e de ser o mais efetivo para tal, outras substâncias também atuam na estimulação da vascularização tumoral. Entre elas cita-se o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF-2), fator de crescimento de hepatócitos (FGH), entre outros (LOHELA et al., 2009).

Estudos sobre a expressão de VEGF em neoplasias animais são mais abundantes em cães. Citando alguns, temos trabalhos recentes em tumores de mama (MILLANTA et al., 2010) em fibrossarcoma (AL-DISSI et al. 2009) e tumores epiteliais nasais (SHIOMITSU et al., 2009), relatando boa correlação entre a expressão de VEGF e as características histopatológicas malignas das neoplasias.

Em gatos, os trabalhos que relatam a pesquisa de VEGF são mais escassos na literatura. Millanta et al. (2006) relatam que o VEGF, é considerado um bom marcador para a avaliação do prognóstico em neoplasias mamárias de gatas, pois observou-se que o VEGF teve correlação com a gradação da neoplasia e taxa de sobrevivência. Os autores encorajam e destacam a necessidade de mais estudos envolvendo o VEGF e a densidade de neovasos nos tumores mamários de cadelas e gatas.

O possível aumento de expressão de VEGF nos tumores de mama atuando de forma a facilitar a progressão tumoral, a invasão e a formação de metástases, tem estimulado cada vez mais a utilização da modulação deste como alvo de tratamento. Diversas drogas antiangiogênicas antagonistas de VEGF estão sendo estudadas, porém, a correlação entre os níveis de

expressão e o prognóstico da doença ainda não foram definidos (BOUDREAU e MEYERS, 2003).

Segundo a literatura, trabalhos utilizando drogas antiangiogênicas, não apresentaram resultados satisfatórios. A razão pela não efetividade das drogas ainda permanece obscura, porém relata-se a possibilidade de resistência tumoral a drogas utilizadas ou ainda persistência maciça de fatores estimuladores de VEGF e ainda outros fatores de angiogênese (YU et al., 2002; BOUDREAU e MEYERS, 2003).

4.3 Proteína Ki-67

Além dos parâmetros referentes à vascularização e o potencial de degradação da membrana basal, o índice proliferativo da neoplasia tem sido considerado um importante indicador do prognóstico para diversas neoplasias, e associam-se com os índices de malignidade da massa (ELSTON e ELLIS 1998; SAKAI et al., 2003; SEIXAS et al., 2011; ZAPPULLI et al., 2005).

A proteína não histona Ki-67 foi descoberta em 1991 pelo isolamento de fragmentos de DNA de células em atividade de multiplicação (GERDES et. al., 1991). Esta proteína é expressa durante todas as fases do ciclo celular, exceto em G0, podendo ser utilizada para determinação do índice proliferativo tecidual. Além disto, correlaciona-se de forma positiva com outros marcadores de proliferação celular (ELLIS et al., 1996).

A sua expressão em células ativas no ciclo celular, permite que esta seja usada amplamente para avaliar o índice proliferativo de neoplasias, de forma a prever o prognóstico em pacientes com câncer, incluindo o câncer de mama (URRUTICOECHEA et al., 2005).

Esta proteína possui uma meia vida de cerca de 60 a 90 minutos e alguns autores citam que existem variações dos níveis de Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular (LOPEZ et al., 1991). Alguns autores notaram que níveis mínimos de Ki-67 são observados em G1 e os níveis máximos da sua expressão ocorrem na fase de mitose, fato que poderia indicar uma imprecisão em relação a fase do ciclo, porém não interferindo no índice proliferativo (KILL, 1996).

Com o desenvolvimento de novos clones, principalmente o MIB-1, o MIB-3, e o SP6, obteve-se melhores imuno-marcações, com redução da inespecificidade e melhor padronização da técnica de imuno-histoquímica, permitindo análise de imagens mais acuradas (ZABAGLO et. al., 2010).

Diversos fatores têm sido usados para determinar o prognóstico de pacientes com câncer, como tamanho de massa tumoral, envolvimento de cadeia linfática, necrose, entre outros. A busca por parâmetros mais específicos que indiquem o comportamento neoplásico a fim de se predizer o prognóstico do paciente ainda é grande, entre estes parâmetros destaca-se o índice de proliferação da massa neoplásica, e uma das ferramentas uteis para tal é o uso da proteína Ki-67 (BACUS et. al., 1989).

Apesar do índice de proliferação neoplásica não indicar isoladamente o potencial metastático do tumor, estudos recentes indicam que maior índice de proliferação desempenha um papel importante na agressividade biológica (MILANTA et al., 2000). Devido a isto, a determinação da taxa de crescimento pode ser estimada pela análise de expressão da Ki-67, tornando esta proteína auxiliar na avaliação do prognóstico pacientes com câncer, em especial em gatas com neoplasia mamária, pois nesta espécie parâmetros de proliferação em relação a agressividade da massa e do prognóstico do paciente relacionado aos índices proliferativos do tumor permanecem obscuros (PREZIOSI et al., 2002).

4.4 Infiltrado Inflamatório tumoral

Outra maneira de se avaliar o prognóstico de algumas neoplasias é a caracterização da intensidade e da população de células inflamatórias que compõe o infiltrado intra e/ou peritumoral (DIEFENBACH e RAULET, 2002; MACCHETTI et al., 2006; VGENOPOULOU et al., 2003).

O sistema imune é dividido em dois contingentes: o humoral, composto pelos linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, e o celular, composto principalmente pelos linfócitos T. Há estimativas que demonstram que em 20% das pessoas que morrem de câncer, os tumores estavam direta ou indiretamente relacionados a processo infeccioso ou a condições inflamatórias exacerbadas. Além disto, estudos indicam que a inflamação, não

controlada, aumenta o risco de desenvolver câncer. Por outro lado, existem estudos que mostram que em certas circunstâncias, a resposta inflamatória pode resultar em redução ou mesmo desaparecimento de tumores (DIEFENBACH e RAULET, 2002).

Os linfócitos são células capazes de expressar grande variedade de receptores para antígenos com isso reconhecem uma grande variedade de substâncias estranhas (ABBAS et al., 2004), inclusive antígenos tumorais, tumor específicos e antígenos associados aos tumores expressos por células normais, que podem estar acumulados nos tumores (CHAMMAS et al., 1999).

A importância da resposta imune na patogênese de várias doenças é bem descrita. No entanto, o papel da resposta imunológica nas doenças neoplásicas e, em especial as neoplasias de mama, necessitam melhores estudos (THRALL, 2007). O infiltrado inflamatório tumoral ou peri-tumoral, constituído predominantemente de linfócitos é comum em vários tipos de neoplasias, inclusive nos carcinomas de glândula mamária, o que sugere a existência de uma resposta imune local contra o tumor (MANZANO, 2001).

As células inflamatórias estão presentes em diferentes quantidades no microambiente mamário e sabe-se que este componente celular heterogêneo possui papel crucial na patogênese tumoral, fato comprovado por alguns autores (BOSETTI et al., 2005; VGENOPOULOU et al., 2003). Apesar do envolvimento imunológico evidente nos tumores de mama, o crescimento e a disseminação dos tumores colocam em questão o papel do infiltrado inflamatório tumoral (VGENOPOULOU et al., 2003).

Ainda não há uma conclusão sobre a correlação entre influência dos leucócitos em diferentes tipos histológicos de carcinomas mamários, porém estas relações podem ser importantes considerando-se o papel do sistema imunológico na patogênese e progressão tumoral (MARSIGLIANTE et al., 1999)

Estudos sugerem o envolvimento de células inflamatórias com papéis distintos no ambiente neoplásico (COLLEONI et al. 2005). Nos tumores de mama, a relação entre o infiltrado inflamatório, intensidade e classificação histológica não foi bem determinado, mas parece ser característico de acordo com cada padrão morfológico, o que requer melhores avaliações (MACCHETTI et al., 2006).

Muitos estudos apontam que grande atividade linfocitária relaciona-se com prognósticos desfavoráveis, pois podem atuar de forma a facilitar o desenvolvimento do câncer (PUPA et al., 1992; FISHER et al., 1983; VGENOPOULOU et al., 2003). Porém outros estudiosos relatam que a atividade linfocitária pode estar relacionada com prognósticos mais favoráveis (DI PAOLA et al., 1974; VGENOPOULOU et al., 2003).

O sistema imunológico possui a capacidade de identificação de células neoplásicas. Tal capacidade é conhecida como supervisão imunológica, que pode ativar resposta inflamatória na tentativa de combate a células neoplásicas. Porém, estudos demonstram que a supervisão imunológica, em grande parte das neoplasias, pode não ser eficaz, pois os tumores desenvolvem mecanismos de escape. Tais mecanismos incluem a ausência de moléculas estimuladoras do sistema imune pelas células neoplásicas, geração de células mutantes e ainda produção de citocinas antiinflamatórias. (REOME et al., 2004). Pode ocorrer também a diminuição de moléculas MHC de classe I, causando a incapacidade de reconhecimento celular por linfócitos T (LIYANAGE et al., 2002).

Em seres humanos os linfócitos T estão relacionados com imunidade antitumoral eventualmente eficaz. Relata-se também presença de linfócitos T (CD3+) em diversos tipos neoplásicos distintos em cães, gatos, cavalos e bovinos. Sugere-se ainda que a presença de grande quantidade de células CD3+ em tecido neoplásico esta relacionada à maior diferenciação tumoral e menor índice de crescimento (PÉREZ et al., 1999).

Já os linfócitos B (CD79+) estão relacionados com a resposta imune humoral mediada por imunoglobulinas (DAY, 1998). Grande densidade de linfócitos B também relaciona-se com maior diferenciação tumoral e baixas taxas de crescimento neoplásico (PÉREZ et al., 1999).

Em gatos, a literatura é mais escassa em relação a composição do infiltrado inflamatório em neoplasias. Há trabalhos com tipificação de células inflamatórias na queratose actínica e carcinoma de células escamosas (PÉREZ et al., 1999). Porém no ambiente neoplásico mamário, o papel do infiltrado inflamatório permanece obscuro.

Os macrófagos são células inflamatórias presentes em diferentes tecidos a partir da diferenciação dos monócitos da corrente circulatória. Desempenham papel fundamental de imunidade inata e adquirida (GORDON, 1998).

É referido como fundamental em processos fisiológicos, na manutenção da hemostase tecidual através de células senescentes e também nos processos de reparo e remodelação tecidual após episódios inflamatórios (GORDON e TAYLOR, 2005).

A referida plasticidade dos macrófagos, durante muito tempo, colocou em questão o papel destas células no ambiente neoplásico. A presença destas células no tecido confere imunidade imediata contra patógenos e também coordenam o infiltrado leucocitário local (MARTINEZ-POMARES et al., 2003).

Em tumores, os macrófagos são as células inflamatórias presentes em maior quantidade (SICA et al., 2008). Anos atrás acreditava-se que a presença dos macrófagos atuava de forma a combater as células neoplásicas, mas sabe-se atualmente que estas células oriundas do sangue, dependendo do fenótipo envolvido, possuem papel importante na progressão tumoral (KRÓL, et al. 2011), o que relaciona a presença de um infiltrado de macrófagos no ambiente tumoral a mau prognóstico (SICA, et al. 2008).

A progressão tumoral, facilitada pelos macrófagos pode ocorrer dependente do fenótipo do macrófago presente no tecido (OSTRAND-ROSENBERG, 2008). O macrófago do tipo I, possui atividade proinflamatória, sendo capaz de produzir óxido nítrico, citocinas e quimiocinas, enquanto os macrófagos do tipo II, através da produção de interleucinas 4 e 13 e de fatores de crescimento, dão suporte a angiogênese tumoral (GORDON, 2003).

Diversos trabalhos na tentativa de caracterização do infiltrado inflamatório de macrófagos foram realizados, e sugeriu-se que a presença destes no ambiente tumoral relacionam-se com piores prognósticos, com alta índice de proliferação vascular (LEEK et al., 1996; TSUTSUI et al., 2005), e liberação de fatores de crescimento (LIN et al., 2001). Em contrapartida, trabalhos atuais demonstram que no câncer de mama o índice de infiltração macrófágica pouco se relaciona com o prognóstico da doença e não pode ser considerado como marcador de prognóstico independente em carcinomas mamários (MAHMOUD et al., 2011), porém, um elevado índice de macrófagos já foi encontrado, com diferença significativa, em classificações histológicas de

tumores mamários humanos, com maior grau de anaplasia (TSUTSUI et al., 2005; ZHU et al., 2008).

De fato, os macrófagos possuem grande importância na patogênese tumoral. Shirabe et al. (2011) relacionaram a presença dos macrófagos no microambiente tumoral a progressão tumoral a maior índices de metástase em pacientes com carcinoma hepatocelular. No microambiente mamário neoplásico das gatas, a presença deste tipo celular possui papel incerto e ainda não bem determinado.

4.5 Objetivos

Devido à escassez de trabalhos relacionados a marcadores de prognóstico em gatas com câncer de mama, o objetivo deste estudo foi avaliar a existência de correlação entre os níveis de expressão imuno-histoquímica da MMP-9 com a vascularização tumoral, expressas pelo VEGF-A, e os índices de proliferação celular, expressos pela proteína Ki-67, assim como a intensidade do infiltrado inflamatório de linfócitos T, B e macrófagos. Para tal, as neoplasias mamárias foram avaliadas segundo as classificações morfológicas propostas por Misdorp et al. (1999), da Organização Mundial de Saúde, e seguindo o método de Nottingham modificado por Elston e Elis (1998) que utiliza a gradação histológica dos carcinomas de mama em gatas.

5. MATERIAL E METODOS

5.1 Amostras

Foram avaliadas 32 amostras de neoplasia mamária de gatas obtidas dos arquivos do serviço de Patologia Veterinária da FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e do Laboratório de Patologia e Biologia molecular “VetPat” de Campinas. Os cortes histológicos foram corados com Hemaossilina e Eosina (HE), classificados morfológicamente e agrupados de acordo com Misdorp et al. (1999). No total foram avaliados 18 carcinomas tubulopapilares, 6 carcinomas sólidos e 8 carcinomas cribriformes de glândula mamária (FIGURA 2). As amostras foram classificadas também de acordo com o grau histológico seguindo os parâmetros descritos por Elston e Ellis (1998) em grau I (baixo grau), grau II (grau intermediário) e grau III (alto grau), seguindo critérios de organização celular e malignidade (anaplasia). Esta classificação atribuiu pontuação a três características distintas: a porcentagem de área de formação tubular, ao índice de pleomorfismo nuclear e ao índice mitótico da massa. O resultado da soma da pontuação classifica o grau histológico da amostra. De acordo com esta classificação, as amostras foram segregadas em 13 amostras classificadas como baixo grau, nove amostras em grau intermediário e 10 classificadas como alto grau.

5.2 Imuno-histoquímica

Para a avaliação da expressão imuno-histoquímica dos marcadores utilizados, foi realizada a recuperação antigênica em panela a vapor durante 30 minutos com tampão citrato pH 6. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução para bloqueio da peroxidase endógena por 30 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi aplicada solução de leite em pó desnatado (Molico^{®1}) a 3% por 30 minutos e em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, na diluição

¹ 2009, Nestlé Brasil Ltda.

² DAKO North America Inc. USA

padronizada para cada um, em câmara úmida a 4°C por 18-22 horas (Tabela 2).

O anticorpo secundário biotinilado (DAKO^{®2} K0690) foi adicionado aos cortes que foram incubados por 45 minutos, em câmara úmida. Após lavagem foi aplicado o complexo streptoavidina-peroxidase (DAKO[®] K0690) também por 45 minutos, em câmara úmida. A lavagem padrão realizada por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS (solução tampão com fosfatos) pH 7,2 - 7,4, foi efetuada entre todas as etapas, exceto após o bloqueio dos sítios inespecíficos com leite desnatado. A reação foi revelada com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina, DAKO[®]). Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, desidratados em sequência de banho com etanol em concentrações crescentes, diafanizados com xilol, e montados em bálsamo do Canadá (VETEC^{®3}) sob lamínula. Para verificar ausência de reação inespecífica, para cada anticorpo foram utilizados controles negativos, onde foi omitido o anticorpo primário. Além disto, os anticorpos primários também foram testados em e tecido de glândula mamária normal. Para controle positivo da marcação para os anticorpos anti-CD3, anti-CD79, anti-MAC382 e anti-Ki-67 utilizou-se linfonodo felino. Para a MMP-9 utilizou-se tecido neoplásico (tumor de mama) humano, e para o VEGF utilizou-se tecido felino (tonsila) com alto índice de vascularização ambos de acordo com as recomendações do fabricante.

² DAKO North America Inc. USA

³ Vetec Química Fina Ltda. RJ – Brasil

Tabela 2 - Anticorpos, clones, diluição e tampão de recuperação antigênica utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Diluição	Clone	Espécie	Recuperação antigênica	Laboratório
MMP-9	1:400	562A4	Camundongo	Tampão Citrato pH 6,0	Millipore
VEGF	1:400	A20	Coelho	Tampão Citrato pH 6,0	Santa Cruz Biotechnology
CD3	1:200	CD3	Coelho	Tampão Citrato pH 6,0	DAKO
CD79	1:100	HM57	Camundongo	Tampão Citrato pH 6,0	DAKO
MAC	1:200	MAC382	Camundongo	Tampão Citrato pH 6,0	DAKO
Ki67	1:25	MIB1	Camundongo	Tampão Citrato pH 6,0	DAKO

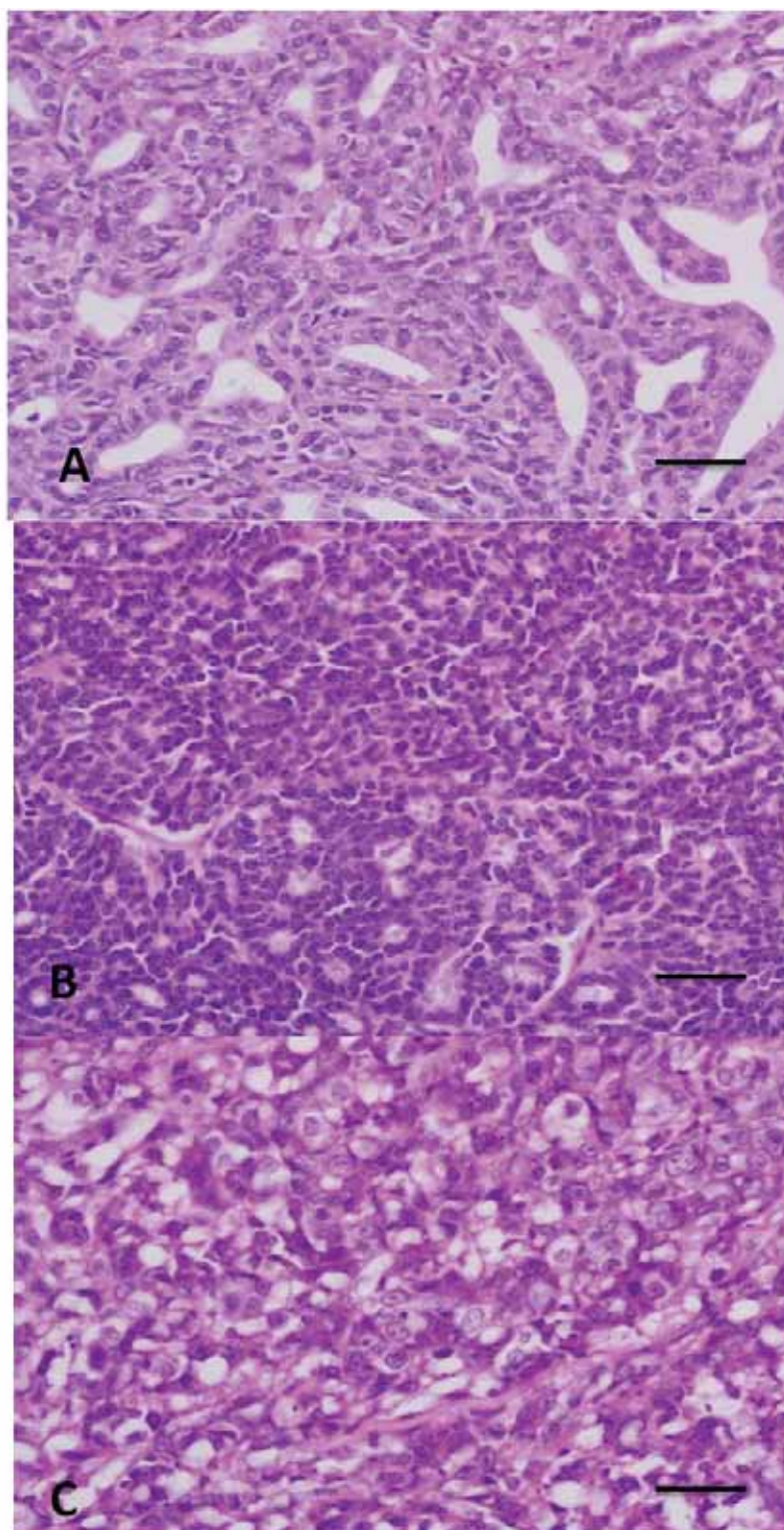


Figura 2 – Fotomicrografia de neoplasia mamaria em gata. A: Carcinoma Tubulopapilar. B: Carcinoma cribriforme. C: Carcinoma sólido de glândula mamária (HE – objetiva de 40 x. barra: 50 micrometros).

5.3 Análise de imagem

Os resultados da marcação imuno-histoquímica foram avaliados com auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada utilizando-se o *software* de análise de imagens Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). Uma vez calibrado o sistema, foi realizada a captura de imagens, em objetiva de 40x, com microscópio óptico (OLYMPUS BX50). Foram avaliadas quatro áreas distintas, totalizando 271.518,1 μm^2 . Nas imagens capturadas foi atribuída coloração vermelha para as áreas coradas em marrom, e para as demais áreas foi atribuído coloração amarela. Tal procedimento foi efetuado a fim de avaliar a porcentagem de área imunomarcada.

5.4 Análise estatística

Os valores de porcentagem de área imunomarcada obtidos com o programa de análise de imagem foram avaliados de acordo com a classificação morfológica e a graduação histológica das neoplasias. Para isto foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. A associação entre os marcadores imuno-histoquímicos foi avaliada pela correlação de Spearman. Valores onde $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e valores de P entre 0,05 a 0,1 foram considerados como tendência estatística. Os dados foram expressos pela mediana (estimador de medida de posição) e pelo intervalo interquartil (estimador de medida de dispersão). Todas as análises foram realizadas usando-se o *software* Prism 5 (GraphPad, San Diego, Estados Unidos da América).

6. RESULTADOS

As células neoplásicas imunomarcadas com o anticorpo Anti - MMP-9 mostraram nítida marcação intracitoplasmática, com variações de intensidade nas diferentes classificações. Padrão semelhante foi observado na marcação com o anticorpo Anti - VEGF-A, porém este anticorpo apresentou também uma maior marcação intersticial em fibroblastos, assim como intensa expressão da proteína no núcleo das células neoplásicas (Figura 3). Para o anticorpo Anti Ki-67 a marcação foi observada estritamente intranuclear e bem delimitada. A marcação das células CD3+, CD79+ e macrófagos foi observada predominantemente em região peritumoral. Os linfócitos com marcação positiva para CD79, CD3 e os macrófagos foram identificados por sua marcação citoplasmática intensa e pelo padrão morfológico característico (Figura 4).

A avaliação estatística para a marcação da MMP-9 mostrou que existe uma tendência na variação estatística ($P = 0,0845$) entre as amostras classificadas de acordo com a OMS. Já quando foi utilizado a graduação histológica das amostras constatou-se diferença significativa ($P = 0,0020$) entre os grupos (Figura 5).

Para a marcação com o anticorpo anti - VEGF-A, não se observou diferença entre os grupos, independente do padrão de classificação utilizado (Figura 6).

Padrão parcialmente semelhante ao observado para a MMP-9 foi visto quando avaliado. O índice de proliferação celular, identificado pela proteína Ki-67, sendo que apenas quando as neoplasias foram segregadas de acordo com a graduação histológica, houve uma tendência estatística na variação entre os grupos, com $P = 0,0675$, sugerindo maior potencial de proliferação nas amostras de maior grau histológico de anaplasia (Figura 7).

Em relação ao infiltrado inflamatório de células T CD3+ foi observada diferença significativa entre as amostras em ambos os padrões de classificação avaliados. Nas amostras segregadas de acordo com o padrão morfológico, observou-se diferença significativa com $P = 0,0319$, e quando classificadas de

acordo com a graduação histológica a diferença estatística foi mais evidente, com valor de $P = 0,0173$ (Figura 8).

Não houve diferença estatística significativa em relação a composição do infiltrado inflamatório (linfócitos T, B e macrófagos) entre os carcinomas mamários quando agrupados segundo os diferentes padrões de classificação

Foi realizado teste estatístico de Spearman para verificar se existia correlação entre o índice de expressão imunoistoquímica dos diferentes marcadores e, observou-se diferença estatística significativa entre os níveis de imunomarcação de MMP-9 e Ki-67 ($P=0,0072$), entre os níveis de MMP-9 e quantidade de células TCD3+ ($P=0,0343$) e também entre os índices da Ki-67 e o infiltrado de linfócitos TCD3+ ($P= 0,0101$) (Figura 11). Não houve correlação entre os outros marcadores utilizados.

Observou-se também que grande porcentagem das amostras graduadas de acordo com método de Nottingham modificado em grau I foram classificadas como tubulopapilares, e que a maioria das amostras classificadas como grau II e III foram cribriformes e sólidas (Figura 12).

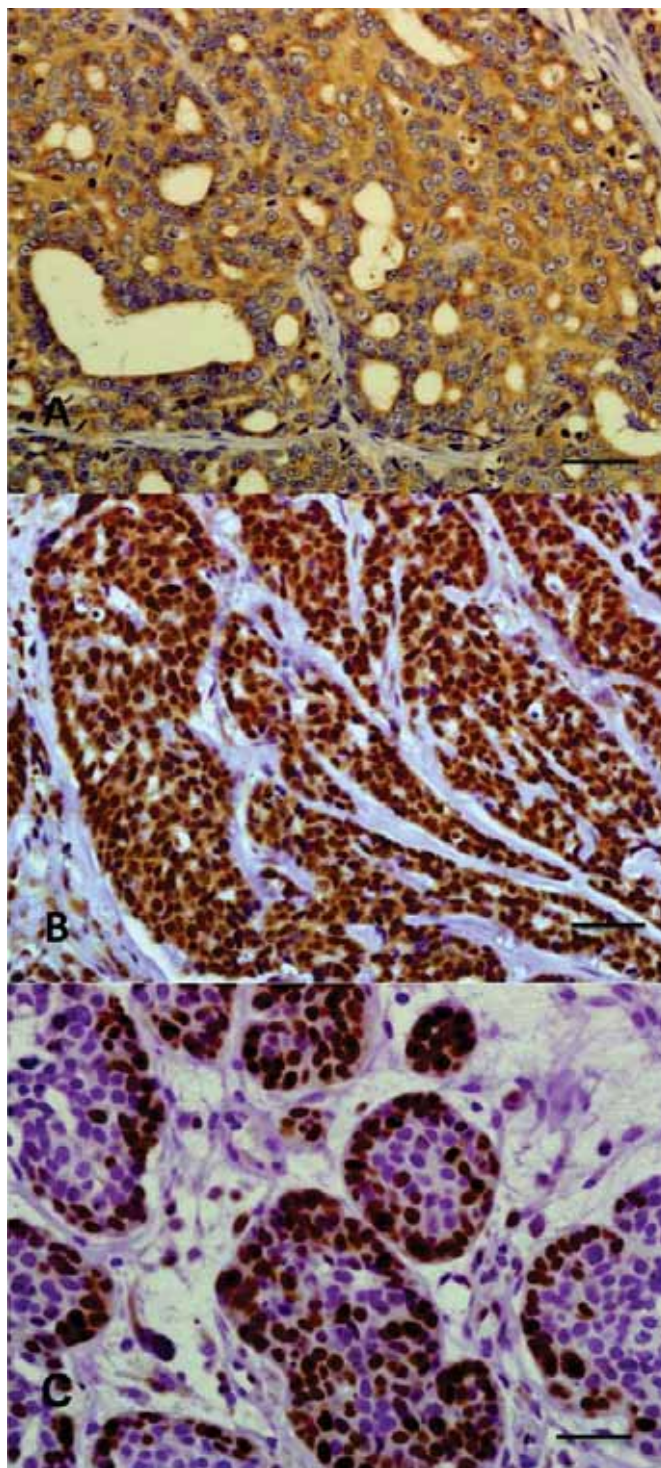


Figura 3 – Fotomicrografia de diferentes marcadores de prognóstico em carcinoma cribriforme de glândula mamária em gatas. (40x. Método Steptoavidina-peroxidase, revelador DAB) A: marcação imunoistoquímica Anti-MMP-9, intensa marcação intracitoplasmática. B: intensa marcação intranuclear e intracitoplasmática Anti – VEGF-A, moderada marcação intersticial. C: Imunomarcação intensa intranuclear bem delimitada Anti-KI-67.

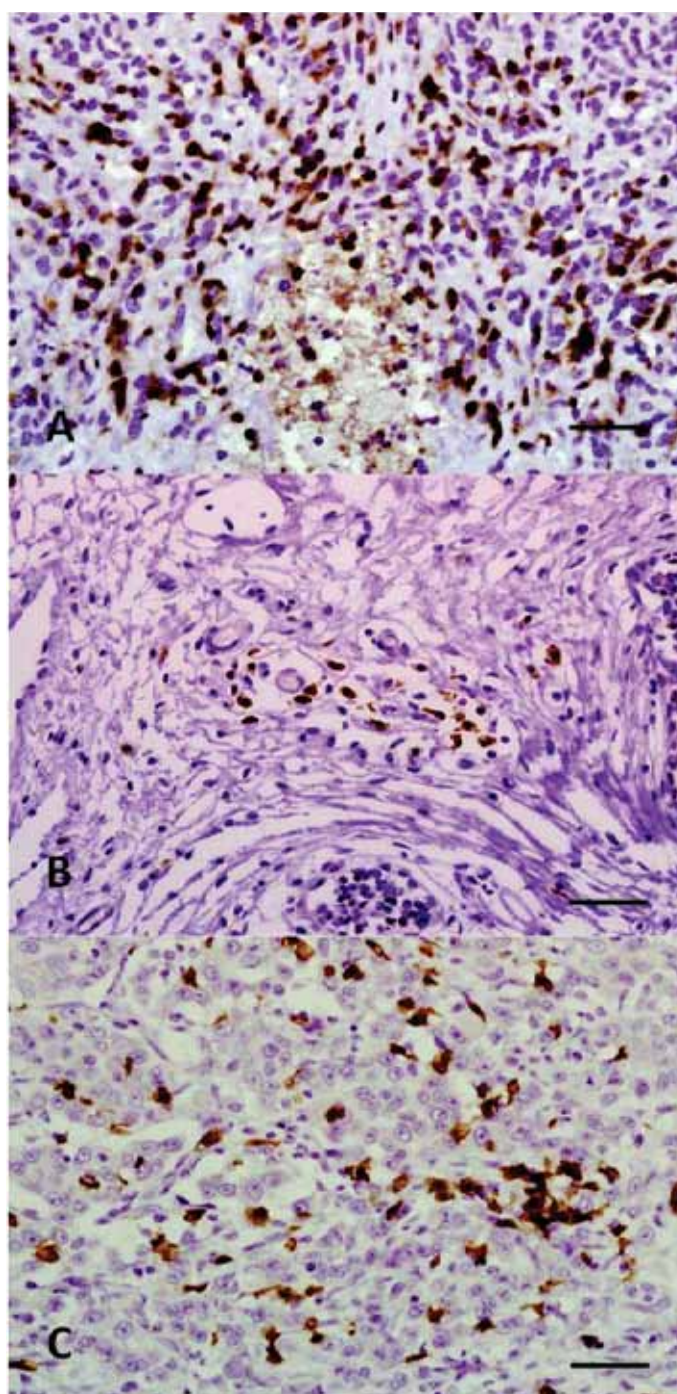


Figura 4 – Fotomicrografia de diferentes marcadores de prognóstico em carcinoma cribriforme de glândula mamária em gatas. (Objetiva de 40x. Método Steptoavidina-peroxidase, revelador DAB) A: marcação imunoistoquímica Anti-CD3, intensa marcação intracitoplasmática. B: intensa marcação intracitoplasmática Anti - CD79. C: Imunomarcação intensa intracitoplasmática Anti-MAC382.

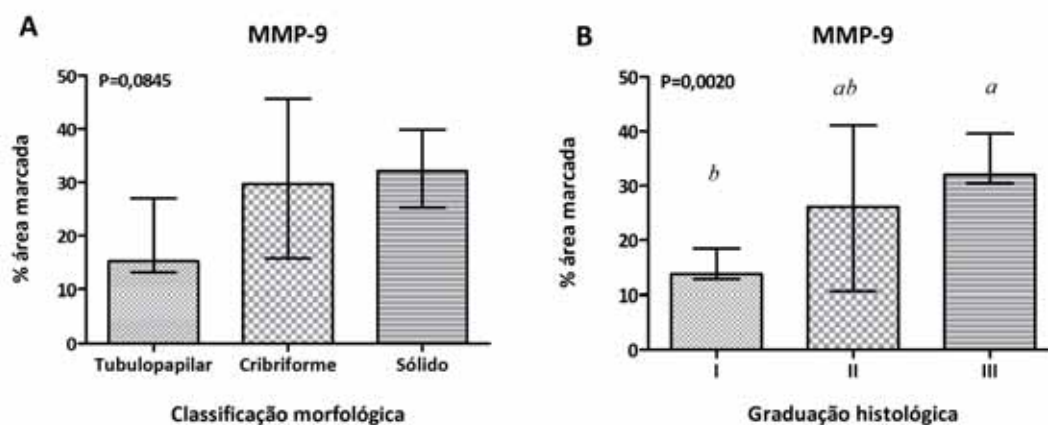


Figura 5. Porcentagem de área imunomarcada para a MMP-9. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas, *a* e *b* diferem se entre si.

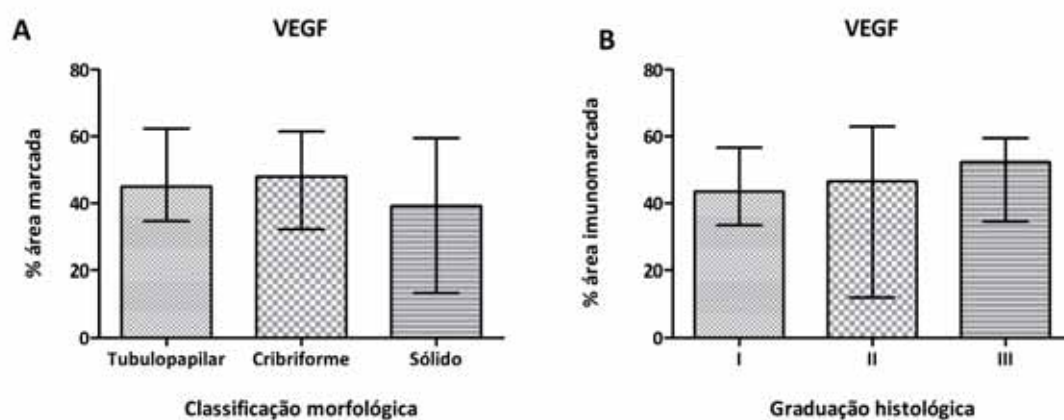


Figura 6. Porcentagem de área imunomarcada para a VEGF – A. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.

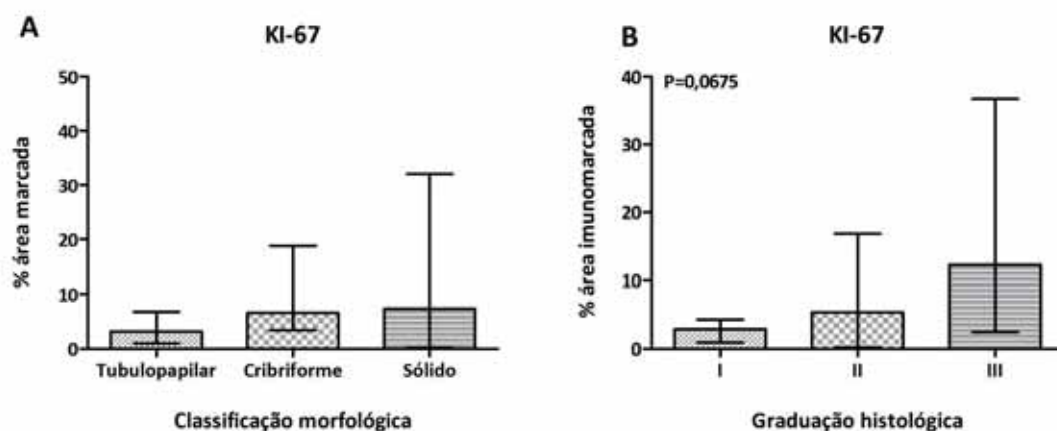


Figura 7. Porcentagem de área imunomarcada para a proteína Ki-67. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.

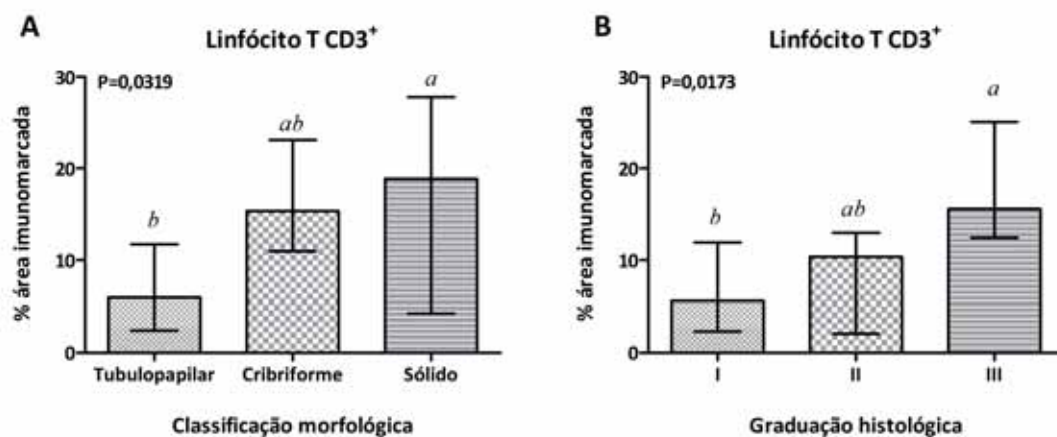


Figura 8. Porcentagem de área imunomarcada por células TCD3+, *a* e *b* diferem-se entre si. A: Porcentagem de área imunomarcada por linfócitos TCD3 nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes graduações histológicas.

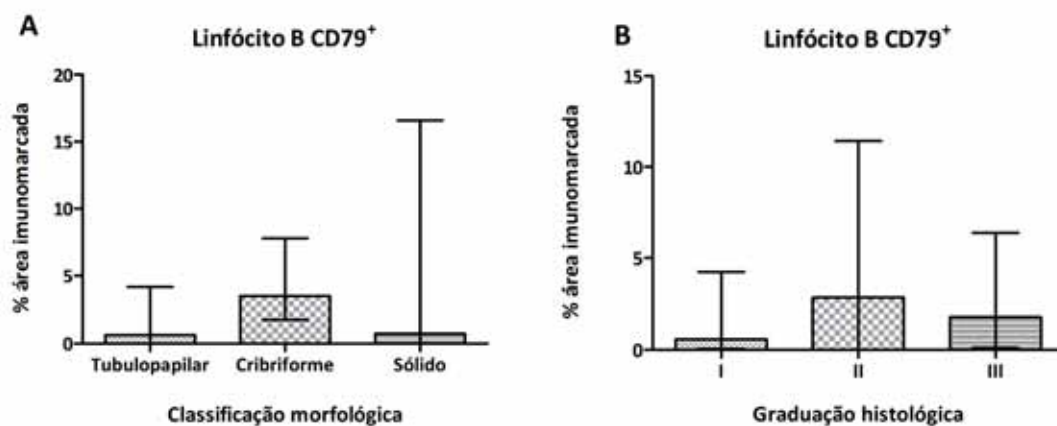


Figura 9. Porcentagem de área imunomarcada pelo infiltrado inflamatório de linfócitos B CD79⁺. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes gradações histológicas.

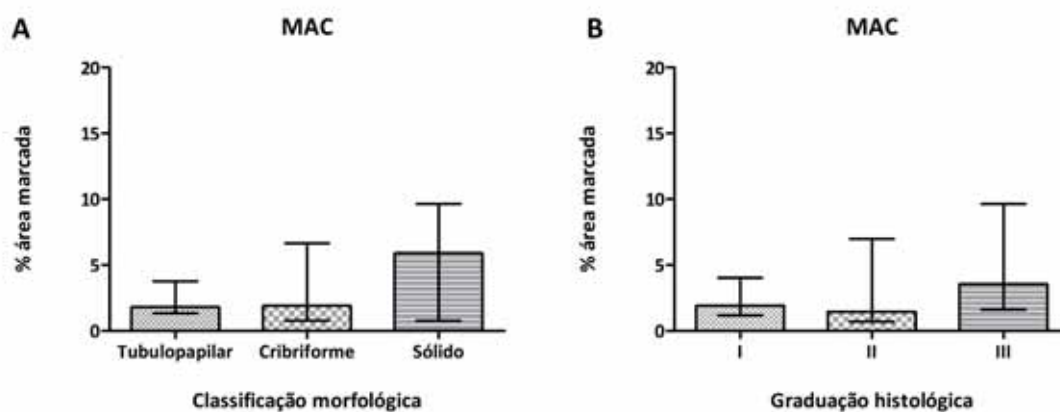


Figura 10. Porcentagem de área imunomarcada por macrófagos marcados pelo Anti-MAC382. A: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes classificações morfológicas dos tumores mamários em gatas. B: Porcentagem de área imunomarcada nas diferentes gradações histológicas.

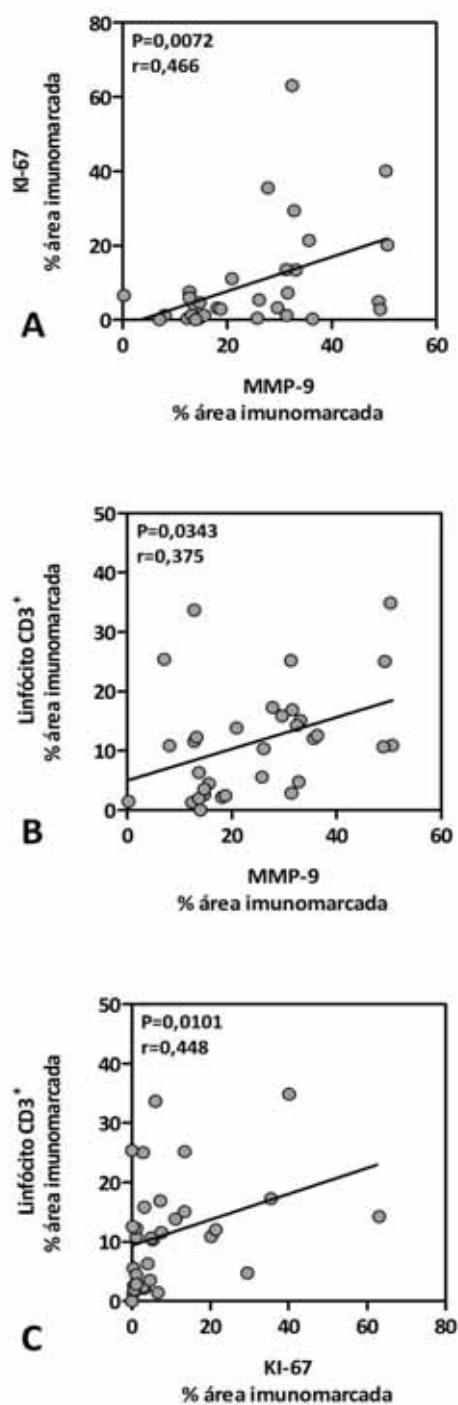


Figura 11. Correlação entre a imunomarcção entre alguns marcadores detectados por imuno-histoquímica nos tumores mamários em gatas. A: correlação entre a expressão protéica entre MMP-9 e Ki67. B: correlação entre a expressão protéica da MMP-9 e Linfócitos TCD3+. C: correlação entre a expressão da proteína Ki67 e células TCD3+.

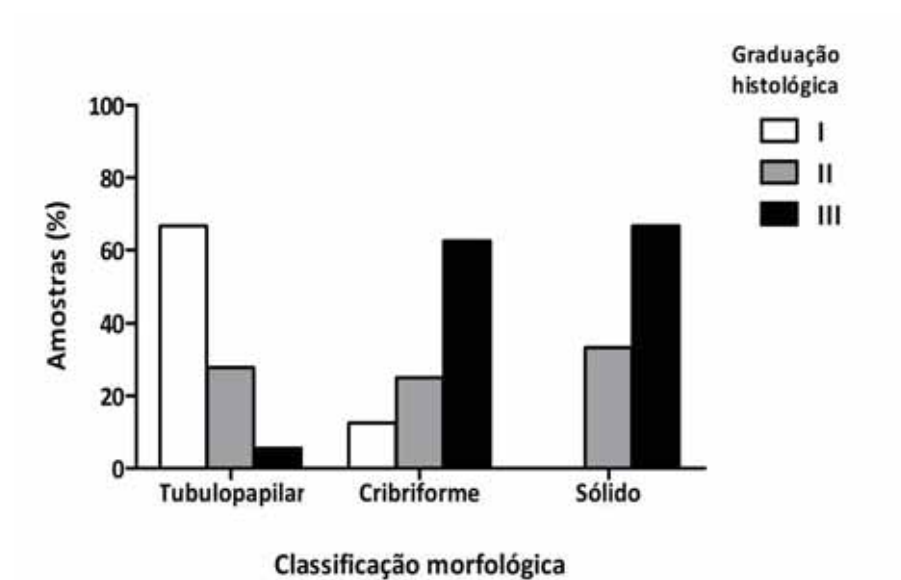


Figura 12. Porcentagem de amostras graduadas em graus I, II e III, nas diferentes classificações morfológicas dos tumores de mama em gatas.

7. DISCUSSÃO

A MMP-9, também conhecida como gelatinase B, é responsável pela da degradação do colágeno tipo IV, e sua expressão é importante em todos os estágios do câncer de mama (JOBIM et al., 2008), logo, uma produção aumentada de MMP-9 pode atuar de forma a facilitar a invasão celular e a consequente promoção de metástase. Além da degradação do colágeno do tipo IV, a MMP-9 possui capacidade de degradação do colágeno do tipo V, XI e XVI (VISSE e NAGASE, 2003).

Não foi observada diferença significativa na imunomarcação da MMP-9 quando as neoplasias foram classificadas apenas quanto ao padrão morfológico em tubulopapilar, cribriforme e sólido (MISDORP et al., 1999), porém, houve tendência em variação estatística quando estes padrões foram comparados ($P = 0.0845$). O maior número de células imunomarcadas para MMP-9 foi observado nas amostras de carcinoma cribriforme e sólido, mesmo sem diferença estatística significativa evidente entre os grupos, aparentemente estes tumores estariam mais aptos para realizar invasão do tecido adjacente e gerar metástases, o que pode estar relacionado com pior prognóstico. Quando avaliados quanto à gradação histológica (ELSTON e ELIS, 1998) houve diferença significativa entre os tumores graduados como I, II e III (Figura 5B), o que reforça a ideia de que a produção de MMP-9 é maior conforme o comportamento maligno da neoplasia e, portanto pior é o prognóstico. Resultados semelhantes foram observados por Baker et al. (2002), onde maior expressão proteica de proteases em tumores de mama em mulheres estavam relacionados com maiores índices celulares de malignidade. Fato este que pode indicar a MMP-9 como um bom marcador preditivo (CURRAN e MURRAY, 2000), podendo ser alvo de tratamento em pacientes com neoplasias de maior grau histológico e morfológico de malignidade.

Koivunen et al., (1999) observaram maior sobrevida em animais tratados com peptídeos sintéticos Anti - MMP-9. Wylei, (1999), mostrou que o aumento da expressão imuno-histoquímica da MMP-9 pode nortear o tratamento de pacientes com neoplasia.

Existem evidências de que níveis elevados de MMP-9 em neoplasias relacionam-se com maiores índices de proliferação vascular e angiogênese em

tumores de mama. Hao et al. (2007), em estudo com carcinomas mamários humanos, observaram que a imunomarcção do VEGF aumentava de acordo com os índices da MMP-9, atribuindo a esta um potencial de estímulo a migração e proliferação de células endoteliais, resultado em angiogênese. O mesmo também foi descrito por Kim et al. (2006), que observaram maiores índices de expressão de VEGF concomitante ao de MMP-9, verificando ainda maiores índices de metástase em linfonodo regional, e sugerindo pior prognóstico em pacientes com amostras com alto índice de expressão destes marcadores. Desta forma, tumores mais aptos a degradar membrana basal também estariam mais aptos a estimular a formação de novos vasos, facilitando os mecanismos de geração de metástases.

Jobim et al. (2008), assim como Baker et al. (2002), não encontraram correlação entre os dois marcadores em diferentes gradações histológicas de tumores de mama em mulheres. O mesmo foi constatado neste trabalho, onde não foi observada relação entre a expressão dos níveis de VEGF-A com os níveis de MMP-9. Tal fato que pode ser justificado, pois a clivagem de proteínas extracelulares pelas MMPs, e a degradação do colágeno IV, promovem além do estímulo da secreção do VEGF a liberação de endostatina, que por sua vez, possui potencial de inibição de angiogênese (BOUDREAU e MAYERS, 2003; DUFFY et al., 2000).

Apesar de não haver correlação entre a imunomarcção para VEGF-A e para a MMP-9 nos carcinomas mamários estudados, houve intensa marcação imuno-histoquímica do primeiro, na maior parte das amostras estudadas, evidenciando que mesmo sem a correlação com a MMP-9, os carcinomas mamários em gatas, independente do padrão de classificação utilizado estariam aptos a estimular angiogênese, proporcionando substrato para progressão tumoral, podendo ser este um dos fatores que resultam no pior prognóstico das neoplasias mamárias relatado em gatas.

Em relação à imunomarcção de células em proliferação Ki-67 positivas, não se observou diferença significativa entre os grupos classificados morfológicamente, entretanto observou-se uma tendência de aumento da marcação para a Ki-67 nas neoplasias de baixo grau, grau intermediário e alto grau, ou seja, neoplasias de maior taxa de anaplasia, de maior gradação histológica, tendem a ter um potencial proliferativo maior. Este fato pode ser

facilmente explicado quando se utiliza a classificação de Elston e Ellis (1998), que considera o índice mitótico para graduação da malignidade da neoplasia, e, portanto, quanto maior o número de mitoses maior a gradação da massa neoplásica. Os níveis mínimos da Ki-67 são observados em G1 e os níveis máximos de expressão ocorrem em fase de mitose, indicando melhor o índice proliferativo da massa (KILL, 1996), sendo assim, a Ki-67 poderia ser utilizada como método auxiliar na contagem de mitoses da neoplasia, facilitando a graduação das mesmas.

Alguns autores citam que altos níveis de expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 relacionam-se com maior agressividade biológica, mas não obrigatoriamente com o potencial metastático da massa (MILANTA et al., 2000), porém foi observada correlação entre os índices de proliferação expressos pela Ki-67 e os índices da MMP-9, sugerindo que os carcinomas mamários de gatas que possuem maior número de células em proliferação, também possuem maior potencial metastático.

Em relação ao infiltrado inflamatório composto por células T, na classificação morfológica proposta por Misdorp et al. (1999), observou-se diferença estatística significativa nos padrões tubulopapilar, cribriforme e sólido ($p = 0,0319$) (Figura 8A). Resultados semelhantes foram observados quando os tumores foram avaliados segundo a graduação histológica de Elston e Ellis (1998), com valor de $P = 0,0173$ (Figura 8B).

Assim como no trabalho de Macchietti et al. (2006), as amostras avaliadas neste estudo revelaram que uma maior quantidade de células T CD3+ e uma escassez de linfócitos B CD79+ estão envolvidos nos processos neoplásicos das glândulas mamárias de gatas. Em humanos os linfócitos T estão relacionados com imunidade eficaz anti-tumoral em órgãos linfóides (MORETTA, 2002). Há relatos também de grande quantidade de linfócitos T CD3+ em diversos tipos neoplásicos em cães e gatos (VANHERBERGHEN et al., 2009). As células T possuem a capacidade de combate das células neoplásicas por mecanismos de lise tumoral pelo recrutamento de células com função citotóxica, ou ainda pela produção de citocinas que podem ser citotóxicas para o tumor ou interferem com a vascularização do mesmo (CORONELLA et al., 2002; MORETTA, 2002). Sugere-se ainda que a presença de grande quantidade de células TCD3+ em tecido neoplásico está relacionada

à maior diferenciação tumoral e menor índice de crescimento (PÉREZ et al., 1999), ou seja, com melhor prognóstico. Porém, o que foi determinado neste estudo é que o maior número de linfócitos TCD3+ foi observado nas classificações referidas com maior potencial de agressividade de acordo com as classificações propostas por Elston e Elis (1998) e Misdorp et al. (1999), portanto diferindo de PÉREZ et al. (1999), o que indica que a presença dos linfócitos T no tecido neoplásico está relacionado a piores prognósticos.

Macchietti et al. (2006), demonstraram em mulheres com câncer de mama, que os tumores com maior infiltração de células T apresentaram pior prognóstico. Nestes foi observado maior índice de metástase em linfonodos regionais onde o infiltrado inflamatório TCD3+ era mais intenso, evidenciando a atividade destas células como promotoras de proliferação celular a partir da secreção de fatores angiogênicos como o VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (MOR et al. 2004) e algumas interleucinas como a IL-4, e a IL-10, além do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) (CAMP et al., 1996). Os resultados aqui apresentados mostram que as neoplasias mamárias de gatas têm comportamento semelhante às neoplasias mamárias de mulheres, no que diz respeito à composição do infiltrado inflamatório e maiores índices de infiltração de células TCD3+ em classificações morfológicas de maiores índices de malignidade.

Ainda, de acordo com Coronella et al., (2002) e Moretta (2002), existem evidências fracas relacionadas a efetividade de linfócitos B no combate e eliminação de neoplasias, um baixo nível de infiltração inflamatória de células B foi visualizado no microambiente mamário tumoral (Figura 9). Os linfócitos B estão relacionados com a resposta imune humoral mediada por imunoglobulinas (DAY, 1998). O potencial que os linfócitos B apresentam no combate as células tumorais esta atribuído a sua capacidade de ativação do complemento e por estímulo a outras células inflamatórias como macrófagos, células *natural killers* (NK). Poucos estudos revelam evidencias na efetividade dos anticorpos produzidos por linfócitos B no combate a células neoplásicas em condições in vitro (DAY, 1998). Mesmo sem diferença estatística evidente em relação aos linfócitos B presentes nas amostras, visualizou-se maior quantidade destas células no carcinoma cribriforme e amostras de grau

histológico II, sugerindo que nesta classificação exista estímulo mais intenso para o recrutamento de linfócitos B.

Em relação à presença dos macrófagos no microambiente mamário neoplásico, Sica et al. (2008), dizem que esta é a célula inflamatória presente em maior quantidade em neoplasias de mama. Este mesmo autor, assim como Król et al. (2011) atribuem a estas células a capacidade de estímulo a fatores que permitem o crescimento e progressão tumoral, atribuindo a presença destas células no ambiente tumoral um pior prognóstico ao paciente com câncer.

Porém, no presente trabalho, não houve correlação entre os índices de malignidade da massa e a presença de macrófagos, tanto nas diferentes classificações morfológicas quanto nas graduações histológicas utilizadas. Em contrapartida, alguns autores encontraram um maior número de macrófagos em tumores de mama com maiores índices de malignidade e anaplasia (TSUTSUI et al., 2005; ZHU et al., 2008). Porém, assim como Mahmoud et al. (2011), neste estudo o infiltrado inflamatório composto por macrófagos não pode ser considerado um marcador de prognóstico independente nos carcinomas mamários.

Quando avaliada a existência de associação entre os diferentes marcadores estudados, houve correlação positiva entre os níveis de expressão imuno-histoquímica da MMP-9 e da proteína Ki-67, da MMP-9 com o infiltrado inflamatório de células TCD3+, e da proteína Ki-67 com as células TCD3+. Ou seja, quanto maior o potencial de degradação de componentes da matriz extracelular, maior o índice de proliferação celular da neoplasia e também que quanto maior a degradação da matriz extracelular, maior infiltração de linfócitos T. Estes também estão em maior quantidade quanto maior a taxa de proliferação celular. Alguns autores demonstraram que os linfócitos T aumentam a degradação de membrana basal por meio da produção de MMP-9 (OWEN et al., 2003), o que pode ser uma das contribuições das células T, para o pior prognóstico das neoplasias mamárias das gatas.

O índice de proliferação mostrou também correlação com a imunomarcação para a MMP-9, ou seja, quanto maior o índice proliferativo da massa, maior seu potencial de degradação de membrana basal e consequentemente, maior a probabilidade de ocorrer à formação metástases.

O índice proliferativo, determinado pela imunomarcagem para a proteína Ki-67, apresentou correlação também com a quantidade de linfócitos T CD3+ que compunha o infiltrado inflamatório peritumoral, presente em maior quantidade nas amostras classificadas com maior malignidade. Sendo assim, os carcinomas cribriformes e sólidos são referidos como detentores de maior potencial de proliferação e agressividade. Portanto, os resultados obtidos sugerem que quanto maior a infiltração inflamatória de linfócitos T CD3+ e maior o índice proliferativo, demonstrado pela expressão da proteína Ki-67, pior o prognóstico para gatas com neoplasias mamárias.

Dentro da classificação sugerida por Misdorp et al., (1999) as neoplasias malignas das gatas são agrupadas em três padrões distintos de organização celular: carcinoma mamário tubulopapilar, cribriforme e sólido. Alguns autores, em estudos relacionados ao prognóstico do câncer de mama em gatas, não encontraram grandes variações entre as diferentes classificações histológicas proposta por Misdorp et al (1999), evidenciando que esta classificação pouco influi em relação no prognóstico do paciente. Estes autores relatam também que apenas em alguns casos o padrão morfológico pode indicar maior ou menor potencial de agressividade, pois arranjos celulares mais densos apresentam comportamento celular mais agressivo quando associados às características celulares de malignidade (CASTAGNARO et al., 1998; MILLANTA et al., 2002; SEIXAS et al., 2007). Assim, Seixas et al., (2011) relatam que a gradação dos tumores mamários de gatas pelo método de Nottingham modificado por Elston e Ellis (1998) deveria ser o método de eleição para a avaliação da agressividade biológica dos carcinomas mamários felinos e não o padrão morfológico.

Observou-se neste estudo, que grande parte das amostras classificadas como tubulopapilares foram classificadas em grau I, e quando foram atribuídos os graus II e III, o padrão histológico observado foi principalmente o cribriforme e o sólido. Amostras com mais de 75% de formação tubular recebem menores pontuações, que aumenta com a diminuição da formação tubular. Logo, uma maior porcentagem de amostras tubulopapilares graduadas em grau I, e amostra cribriformes e sólidas graduadas em grau II e III seria esperado. Porém, apesar de haver relação entre os métodos de classificação, neste estudo, foram obtidos melhores parâmetros para a avaliação do prognóstico ao

se utilizar o método de Elston e Elis (1998), tal fato pode ser justificado pois este método possui parâmetros mais acurados em relação ao arranjo celular da massa, além de parâmetros de malignidade nuclear mais específicos, considerando também o índice proliferativo pela contagem de mitoses da amostra.

8. CONCLUSÕES

Neste estudo observou-se que a classificação morfológica dos carcinomas de mama em gatas, segundo Misdorp et al., (1999), não é o único parâmetro para determinação do prognóstico da doença quando avaliada junto com os níveis de expressão imunoistoquímica da MMP-9, do VEGF e da Ki67. Utilizando-se esta classificação, apenas a detecção de linfócitos TCD3+ apresentou diferença significativa entre os grupos.

Ao se considerar o grau de anaplasia das células de acordo com Elston e Elis (1998), foram detectados melhores parâmetros imunoistoquímicos para a determinação do prognóstico. Assim, observou-se que os níveis de expressão da MMP-9 são maiores, nas neoplasias de grau II e III nas quais, portanto, existe maior potencial de geração de metástase.

Os linfócitos TCD3+ estavam presentes em maior densidade nas classificações de maior malignidade.

Conclui-se ainda que quanto maior o índice proliferativo determinado pela positividade da proteína Ki-67 das células neoplásicas, maiores são as taxas de degradação da matriz extracelular (aumento da marcação para MMP-9), assim como maior o numero de células T CD3+ presentes no tecido.

O VEGF não se mostrou um bom marcador para prognóstico das neoplasias mamárias de gatas quando estas são segregadas de acordo com a OMS e com o método de Nottingham Modificado, porém, sua grande imunomarcação em todas as classificações possibilita a utilização deste marcador como alvo de tratamento adjuvante no câncer de mama felino.

A metaloproteinase 9 mostrou-se um bom marcador de prognóstico pois houve maior marcação em amostras de maior malignidade, sugerindo que esta possa também ser utilizada como alvo de tratamento em amostras de maior grau de anaplasia.

Foi visualizado também boa correlação entre os métodos de classificação utilizados, porém, o método de Nottingham modificado por Elston e Elis, mostrou indices de determinação de malignidade mais acurados.

A densidade de macrófagos e de linfócitos B não foram bons parâmetros para a determinação do prognóstico em gatas com neoplasia mamária.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, K. A.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Revinter., 2004. p. 544

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor in canine fibrossarcomas. *J. Comp. Pathol.*, v.141, p. 229-236, 2009.

ARESU, L.; GIANTI, N.; MORELLO, E. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC Vet. Res.*, v. 4, n. 7. p. 33, 2011.

AZNAVOORIAN, S.; MURPHY, A. N.; STETLER-STEVENSON, W. G. et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*, v. 71, n. 4, p. 1368-1383, 1993.

BACUS, S. S.; GOLDSCHMIDT, R.; CHIN, D. et al. Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am. J. Pathol.*, v. 135, n. 5, p. 783–792, 1989.

BAKER, E. A.; STEPHENSON, T. J.; REED, M. W. et al. Expression of 24. proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Mol. Pathol.*, v. 55, n. 5, p. 300-4, 2002.

BOS, R.; ZHONG, H.; HANRAHAN, C. F. et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 93, n. 4, p. 309-314. 2001.

BOSETTI, C.; MALVEZZI, M.; CHATENAUD, L. et al. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann. Oncol.*, n. 3, p. 419 – 511, 2005.

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.*, v. 5, n. 3, p.140-6. 2003.

BRY, M.; KIVELÄ, R.; HOLOPAINEN, T. et al. Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation. *Circulation*, v. 26, n. 17, p. 1725-33. 2010.

CAMP, B. J.; DYHRMAN, S. T.; MEMOLI, V. A. et al. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann. Surg. Oncol.*, v. 3, p. 176-84. 1996.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 4, n. 2, p. 153-180. 2011.

CASTAGNARO, M.; CASALONE, C.; RU, G. et al. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNORs) count as indicator of post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 64, p. 97-100, 1998.

CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama na cadela: revisão. *Clin. Vet.*, v. 11, p. 56-64, 2006.

CHAMMAS, R.; SONNENBURG, J. L.; WATSON, N. E. et al. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. *Cancer Res.*, v. 59, p. 1337-1346, 1999.

CHEN, W. T.; WANG, J. Y. Specialised surface protrusions of invasive cells, invadopodia and lamellipodia, have differential MT1- MMP, MMP-2, and TIMP-2 localization. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 878, p. 361-71, 1999.

CHUNG, J.; BACHELDER, R. E.; LIPSCOMB, E. A. et al. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J. Cell. Biol.*, v. 158, n. 1, p. 165-74. 2002.

CHUNG, Y. S.; MAEDA, K.; SOWA, M. Prognostic value of angiogenesis in gastri-intestinal tumours. *Eur J Cancer.*, v. 32, n. 14, p. 1 - 5. 1996.

COLLEONI, M.; ROTMENSZ, N.; PERUZZOTTI G. et al. Size of breast cancer metastases in axillary lymph nodes: clinical relevance of minimal lymph node involvement. *J. Clin. Oncol.*, v. 23, p. 1379-89. 2005.

CORONELLA, J. A.; SPIER, C.; WELCH, M. et al. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J. Immunol.*, v. 169, p. 1829-36. 2002.

CUNNINHAM, J. G. Tratado de fisiologia veterinária, 3. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogam, 2004.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects 2. of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer.*, v. 36, p. 1621-30, 2000.

DAY, M. J. Immunohistochemical characterization of the lesions of feline progressive lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *J. Comp. Pathol.*, v. 119, p. 135-147. 1998.

DI PAOLA, M.; ANGELINI, L.; BERTOLOTTI, A. et al. Host resistance in relation to survival in breast cancer. *BMJ.*, v. 4, p. 268–270. 1974.

DIEFENBACH, A.; RAULET, D.H. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol. Rev.*, v. 188, p. 9-21. 2002.

DUFFY, M. J.; MAGUIRE, T. M.; HILL, A. et al. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.*, v. 2. n. 4, p. 252-7. 2000.

DUTRA, A. P.; GRANJA, N. V. M.; SCHMITT, F. C. et al. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 11, p. 1673-81, 2004.

DVORAK, H. F.; WEAVER, V. M.; TLSTY, T. D. et al. Tumor microenvironment and progression. *J. Surg. Oncol.*, v. 103, p. 468–474. 2011.

ELLIS P. A.; MAKRIS A.; BURTON S. A. et al. Comparison of MIB-1 proliferation index with S-phase fraction in human breast carcinomas. *Br. J. Cancer.*, v. 73, p. 640–3, 1996.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. In: ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. *Systemic pathology: the breast*. London: Churchill Livingstone, 1998. p. 365-84.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; CAVALCANTI, M. F. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, v. 7, n. 4, p. 230-5, 2009.

FISHER, E. R.; KOTWAL, N.; HERMANN, C. et al. Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 107, p. 222–227, 1983.

GASPARINI, G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.*, v. 5, n. 1, p. 37–44, 2000.

GATTO, C.; RIEPPI, M.; BORSOTTI, P. et al. BAY 12-9566, a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with antiangiogenic activity. *Clin. Cancer Res.*, v. 5, n. 11, p. 3603 – 07, 1999.

GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.*, v. 138, p. 867 – 73, 1991.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p. 23-35. 2003.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res. Immunol.*, v. 149, n. 7-8, p. 685-688. 1998.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 5, n. 12, p. 953-64. 2005.

HAO, L.; ZHANG, C.; QIU, Y. et al. Recombination 25 of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer Lett.*, v. 253, n. 1, p. 34-42. 2007.

HERSHEY, E.; DUBIELZIG, R. R.; PADILLA, M. L. et al. Aberrant p53 Expression in Feline Vaccine-associated Sarcomas and Correlation with Prognosis. *Vet. Pathol.*, v. 42, n. 6, p. 805–811, 2005.

HUOVINEN, M.; LOIKKANEN, J.; MYLLYNEN, P. et al. Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. *Toxicol. in Vitro*, v. 25, n. 5, p. 1007–1017, 2011.

JOBIM, F. C.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, N. L. et al. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v. 30, n.6, p. 287-293. 2008.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disorders of the mammary glands of the queen. In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. *Canine and feline theriogenol.*, Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 474-485.

JOHNSON, C.A. et al. Female reproduction tract. In: SHERDING R.G. *The cat: diseases and clinical management*. Philadelphia: WB Saunders, 1994. Chapter 54, p.1853-1876.

KARPANEN, T.; BRY, M.; OLLILA, H. M. et. al. Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circ. Res.*, v. 103, n. 9, p. 1018–1026. 2008.

KILL, I. R. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus: Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J. Cell. Sci.*, v. 109, p. 1253-1263, 1996.

KIM, H. J.; PARK, C. I.; PARK, B. W. et al. Expression of MT-1 27. MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Yonsei Med. J.* v. 47, n. 3, p. 333-42. 2006

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.*, v. 41, n. 2, p. 271-90. 2011.

KOIVUNEN, E.; ARAP, W.; VALTANEN, H. et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnol.*, v. 17, n. 8, p. 768–774, 1999.

KOSSAKOWSKA, A. E.; EDWARDS, D. R.; PRUSINKIEWICZ, C. et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.*, v. 94, n. 6, p. 2080–2089, 1999.

KRÓL, M.; PAWŁOWSKI, K. M.; MAJCHRZAK, K. et al. Density of tumor-associated macrophages (TAMs) and expression of their growth factor receptor MCSF-R and CD14 in canine mammary adenocarcinomas of various grade of malignancy and metastasis. *Pol. J. Vet. Sci.*, v. 14, n. 1, p. 3-10. 2011.

LEEK, R. D.; LEWIS, C. E.; WHITEHOUSE, R. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.*, v. 56, n. 20, p. 4625–29. 1996.

LIN, E. Y.; NGUYEN, A. V.; RUSSELL, R. G. et al. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J. Exp. Med.*, v. 193, n. 6, p. 727– 740. 2001.

LIYANAGE, U. K.; MOORE, T. T.; JOO, H. G. et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.*, v.169, p. 2756-61, 2002.

LOCOPO, N.; FANELLI, M.; GASPARINI, G. Clinical significance of 14. angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, v. 52, n. 3 p.159-73. 1998.

LOHELA, M.; BRY, M.; TAMMELA, T. et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v. 21, n. 2, p.154-65, 2009.

LOPEZ, F.; BELLOC, F.; LACOMBE, F. et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry*, v. 12, n. 1, p. 42-49, 1991.

MACCHETTI, A. H.; MARANA, H. R. C.; SILVA, J. S. et al. Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics*, v. 61, n. 3, p. 203-208. 2006.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Canc. Metastasis Rev.*, v.9, n. 2, p. 125-136, 1990.

MAEDA, K.; KANG, S. M.; ONODA, N. et al. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology*, v. 55, n. 1, p. 594–599, 1998.

MAHMOUD, S. M. A.; LEE, A. H. S.; PAISH, E. C. et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Pathol.*, v. 65, n. 2, p. 159-163. 2011.

MANDARA, M. T.; PAVONE, S.; MANDRIOLI, L. et al. Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Canine and Feline Meningioma. *Vet. Pathol.*, v. 46, n. 5, p. 836–845. 2009.

MANZANO, M. C. A. Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário em biopsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua implicação prognóstica. Tese: mestrado. 104f. Dissertação (mestrado em cirurgia) – Faculdade de ciências médicas, Universidade estadual de Campinas. 2001.

MARSIGLIANTE, S.; BISCOZZO, L.; MARRA, A. et al. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Lett.*, v. 139, n. 1, p. 33-41, 1999.

MARTINEZ-POMARES, L.; REID, D. M.; BROWN, G. D. et al. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J. Leukoc. Biol.*, v. 73, n. 1, p. 604–13, 2003.

MILLANTA, F.; CANESCHI, V.; RESSEL, L. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *J. Comp. Pathol.*, v.142, n. 1, p. 36-42. 2010.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M. et al. MIB-1 labelling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. *Vet. Pathol.*, v. 39, n. 1, p. 120–126, 2002.

MILLANTA, F.; SILVESTRI, G.; VASELLI, C. et. al. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res. Vet. Sci.*, v. 81, n. 3, p. 350-7, 2006.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLME'N, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. In: WHO International histological classification of tumors of domestic animals. 2nd. ed. vol. 7, pp. 11–29. WHO, Washington, DC. Armed Forces Institute of Pathology. 1999. v. 7, p. 11- 29.

MOR, F.; QUINTANA, F. J.; COHEN, I. R. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J. Immunol.*, v. 172, n. 7, p. 4618-23. 2004.

MORETTA, A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 2, n. 12, p. 957-64. 2002.

NAGY, J. A.; CHANG, S. H.; DVORAK, A. M. et al. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br. J. Cancer.*, v. 100, n. 6, p. 865–869, 2009.

NIETO, A.; PEREZ-ALENA, M. D.; DEL CASTILLO, N. et al. BRCA-1 Expression in canine mammary dysplasias and tumors: relationship with prognostic variables. *J. Comp. Pathol.*, v. 128, n. 4, p. 260-8, 2003.

OLSSON, A. K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J. et al. VEGF receptor signaling in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* v. 7, p. 359–371, 2006.

OSTRAND-ROSENBERG S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr. Opin., Genet Dev.* v. 18, n. 1, p. 11-18. 2008

OWEN, J. L.; IRAGAVARAPU-CHARYULU, V.; GUNJA-SMITH, Z. et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. *J. Immunol.*, v.171, n. 8, p. 4340-51. 2003.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1792, n. 4, p. 380-391. 2009.

PAOLONI, M. C; KHANNA, C. Comparative oncology today. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v. 37, n. 6, p.1023-32, 2007.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v.89, n.509, p.10-29, 1994.

PÉREZ, J.; DAY, M. J.; MARTÍN, M. P. et al. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 69, n. 1, p. 33-46, 1999.

PREZIOSI, R.; SARLI, G.; BENAZZI, C. et al. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res. Vet. Sci.*, v. 73, n. 1, p. 53-60, 2002.

PUPA, S. M.; MENARD, S.; ANDREOLA, S. et al. Prognostic significance for c-erbB-2 oncoprotein overexpression in breast carcinoma patients and its immunological role. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, v. 33, p. 312. 1992.

RANOGAJEC, I.; JAKIĆ-RAZUMOVIĆ, J.; PUZOVIĆ, V. et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and aminopeptidase N/CD13 in breast cancer patients. *Med Oncol.* Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Prognostic%20value%20of%20matrix%20metalloproteinase2%20\(MMP\)%2C%20matrix%20metalloproteinase](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Prognostic%20value%20of%20matrix%20metalloproteinase2%20(MMP)%2C%20matrix%20metalloproteinase)

9%(MMP9)%20and%20aminopeptidase%20N%2FCD13%20in%20breast%20cancer%20patients. Acesso em 2 de fevereiro de 2012.

REOME, J. B.; HYLIND, J. C.; DUTTON, R. W. et al. Type 1 and type 2 tumor infiltrating effector cell subpopulations in progressive breast. *Clin. Immunol.*, v. 111, n. 1, p. 69-81. 2004.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v. 11, p. 73–91. 1995.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, v. 9, n. 2, p. 267-85, 2005.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J; MACEWEN, E. G. *Small animal clinical Oncology.*, Philadelphia:WB Saunders. p.455-477. 2001.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N. et al. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, v. 69, n. 5, 2003.

SCHROEN, D. J.; BRINCKERHOFF, C. E. Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms. *Gene Express.*, v. 6, n. 4, p. 197–207, 1996.

SCHWARZE, E.; SCHRÖDER, L. *Compêndio de anatomia veterinária.* Zaragoza: Acribia, 1972. 4v.

SCORILAS, A.; KARAMERIS, A.; ARNOGIANNAKI, N. et al. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *Br. J. Cancer.*, v. 84, n. 11, p. 1488-96, 2001.

SEIXAS, C.; PALMEIRA, M. A.; PIRES, C. et al. Mammary Invasive Micropapillary Carcinoma in Cats: Clinicopathologic Features and Nuclear DNA Content. *Vet. Pathol.*, v. 44, n. 6, p. 842–48, 2007.

SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A. et al. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. *Vet. J.*, v. 187, n. 1, p. 65-71, 2011.

SHIOMITSU, K.; JOHNSON, C. L.; MALARKEY, D. E. et al. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, v. 2, n. 2, p. 106-14, 2009.

SHIRABE, K.; MANO, Y.; MUTO, J. et al. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg. Today.*, v. 42, n. 1, p.1-7, 2012.

SICA, A.; LARGHI, P.; MANCINO, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin. Cancer Biol.*, v. 18, p. 349–355. 2008.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciênc. Rural*, v. 34, n. 2, p.625-633, 2004.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet. Pathol.*, v. 48, n. 1, p.85-97. 2011.

STETLER-STEVENSON, W. G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, L. A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v. 9, p. 541–573. 1993.

SUN, Y.; WENGER, L.; RUTTER, J. L. et al. p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (collagenase- 1) gene expression. *J. Biol. Chem.*, v. 264, n. 17, p. 11535-11540, 1999.

THOR, A. D.; ENG, C.; DEVRIES, S. et al. Invasive micropapillary carcinoma of the breast is associated with chromosome 8 abnormalities detected by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.*, v. 33, n. 6, p. 628–631, 2002.

THRALL, M. A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária, São Paulo: Roca, 2007.

TSUTSUI, S.; YASUDA, K.; SUZUKI, K. et al. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol. Rep.*, v. 14, n. 2, p. 425 - 31. 2005.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, v. 23, p. 7212–20, 2005.

VANHERBERGHEN, M.; DAY, M. J.; DELVAUX, F. et al. An Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Nasal Carcinoma in Dogs and Cats *J. Comp. Pathol.*, v. 141, n. 1, p. 17-26. 2009.

VGENOPOULOU, S.; LAZARIS, A. C.; MARKOPOULOS, C. et al. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. *Breast.*, v. 12, n. 3, p. 172-8, 2003.

VINCENTI, M. P.; WHITE, L. A.; SCHROEN, D. J. et al. Regulating expression of the gene for matrix metalloprotease-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Express*, v. 6, p. 391 – 411, 1996.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors 7. of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* v. 92, n. 8, p. 827-39, 2003.

WANG, R.; ZHANG, J.; CHEN, S. et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*, v. 74, n. 2, p. 188-196. 2011.

WITHROW, S.J.; MACEWEN'S, D.V. *Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis, Missouri. Saunders Elsevier, 2007. p. 846.

WHO. World Health Organization. World cancer day. <http://www.who.int/en/> Acesso em: 20 de agosto de 2011.

WYLEI, S.; MACDONALD, I. C.; VARGHESE, H. J. The matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat inhibits angiogenesis in live metastases of B16F1 melanoma cells. *Clin. Exp. Metast.*, v. 17, n. 2, p. 111 – 117, 1999.

YU, J. L.; RAK, J. W.; COOMBER, B. L. et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science.*, v. 295, n. 5559, p. 1526-8, 2002.

ZABAGLO, L.; SALTER, J.; ANDERSON, H. et al. Comparative validation of the SP6 antibody to Ki67 in breast cancer. *J. Clin. Pathol.*, v. 63, n. 9, p. 800-804, 2010.

ZAPPULLI, V.; DE ZAN, G.; CARDAZZO, B. et al. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J. Dairy Res.*, v. 72, p. 98-106. 2005.

ZHU, X. D.; ZHANG, J. B.; ZHUANG, P. Y. High expression of macrophage colonystimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, v. 21, n. 26, p. 2707-16. 2008.