UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA RESPOSTA IMUNE AOS CARCINOMAS DO TIPO SIMPLES EM MAMA DE CADELAS

Mayara Caroline Rosolem
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA RESPOSTA IMUNE AOS CARCINOMAS DO TIPO SIMPLES EM MAMA DE CADELAS

Mayara Caroline Rosolem
Orientadora: Prof[a]. Ass. Dr[a]. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Co-orientadora: Prof[a]. Ass. Dr[a]. Daniela Bernadete Rozza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2013

Rosolem, Mayara Caroline
R822r Relação entre o infiltrado inflamatório e as células dendríticas na resposta imune aos carcinomas do tipo simples em mama de cadelas / Mayara Caroline Rosolem. – – Jaboticabal, 2013
xvi, 61 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos
Banca examinadora: Geórgia Modé Magalhães, Hélio José Montassier
Bibliografia

1. Cão. 2. Células Inflamatórias. 3. Evasão Imune. 4. Imuno-histoquímica. 5. Neoplasia Mamária. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

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

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA RESPOSTA IMUNE AOS CARCINOMAS DO TIPO SIMPLES EM MAMA DE CADELAS

AUTORA: MAYARA CAROLINE ROSOLEM

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA

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

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. GEORGIA MODÉ MAGALHÃES
Universidade de Franca / Franca/SP

Data da realização: 10 de outubro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MAYARA CAROLINE ROSOLEM – nascida em oito de dezembro de 1987, na cidade de Araruna, Paraná, filha de Elio Rosolem e Vicentina Terezinha Ferreira Rosolem. Iniciou sua graduação em Medicina Veterinária em janeiro de 2005 na Faculdade Integrado de Campo Mourão (PR), tendo finalizado a mesma em dezembro de 2009. Ingressou no programa de aprimoramento profissional na área de Patologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Araçatuba/SP, sob a orientação da Prof[a]. Ass. Dr[a]. Daniela Bernadete Rozza, durante o período de janeiro de 2010 a janeiro de 2011. Ainda no ano de 2011, ingressou no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV - UNESP), Campus de Jaboticabal/SP, sob a orientação da Prof[a]. Ass. Dr[a]. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos.

93 Million Miles - Jason Mraz

93 million miles from the sun
People get ready, get ready
Cause here it comes, it's a light
A beautiful light, over the horizon
Into your eyes
Oh, my my how beautiful
Oh my beautiful mother
She told me, son in life you're gonna go far
If you do it right, you'll love where you are
Just know, wherever you go
You can always come home

240 thousand miles from the moon
We've come a long way to belong here
To share this view of the night
A glorious night
Over the horizon is another bright sky
Oh my my how beautiful, oh my irrefutable father
He told me, son sometimes it may seem dark
But the absence of the light is a necessary part
Just know, you're never alone, you can always come back home

Home, Home

You can always come back

Every road is a slippery slope
But there is always a hand that you can hold on to
Looking deeper through the telescope
You can see that your home's inside of you

Just know, that wherever you go, no you're never alone, you will always get back home

Home, Home
Home
Ohhh

93 million miles from the sun
People get ready, get ready
Cause here it comes, it's a light
A beautiful light, over the horizon
Into our eyes

Dedico este trabalho aos animais que fizeram, fazem e farão parte da minha história. Em especial a gata Cissa (*in memorian*). Sua companhia foi indispensável nestes doze anos que esteve estudando comigo pelas madrugadas afora....

AGRADECIMENTOS

Deus, conhecedor dos meus caminhos. Obrigada Senhor, por me permitir viver este dia.

Aos meus pais Elio e Terezinha. Nunca haverá distância geográfica ou espiritual que vá nos separar.

A minha orientadora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que me possibilitou conseguir dar mais um passo na minha longa caminhada. Saiba que o quanto sou grata por ter me aceitado ser sua orientada naquele dia, em Belo Horizonte.

A professora Daniela Bernadete Rozza, que me co-orientou neste trabalho e que também me orientou durante a residência.

Aos meus eternos cães e gatos! Desde o Mingau e o Apolo, ainda lá no Mato Grosso, até o Biscuit, Pequininho, Rex, Cissa, Lobo, Maya, Paçoca, Fumaça, Babaloo e a Tigresa. Todos me agraciaram com o simples fato de existirem.

Aos meus colegas Ana Carolina Silva, Andresa Matsui, Carolina Bellodi, Claudia Momo, Eduardo Garrido, Érika Terra, Geórgia Magalhães, Giovana Varallo, Janine Denadai, Luciana Curtio, Luis Rivera, Marcio Bandarra, Pamela Moreira, Priscila Lopes, Roberta Lomonte, Rosana Lino, Thaís Castanheira e a todos que, de alguma forma, partilharam comigo seus conhecimentos, aguentaram meus choros e risadas, nos momentos de alegria e de desespero!

Aos professores do Departamento de Patologia Veterinária, Angelo Berchieri Júnior, Gervásio Henrique Bechara e Hélio José Montassier por cederem espaço nos seus respectivos freezers -80ºC, o que possibilitou armazenar todo o material congelado utilizado neste trabalho.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Patologia Veterinária desta instituição, em especial à Francisca de Assis Ardison, Maria Inês Yamazaki de Campos e Moema Makiko Ogassavara pela colaboração e carinho.

Ao Serviço de Oncologia e o Serviço de Reprodução e Obstetrícia desta instituição, pelo atendimento clínico e cirúrgico dos animais que participaram deste trabalho.

As cadelas que participaram desse projeto e seus proprietários.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro fornecido a esta pesquisa (2011/03510-4).

SUMÁRIO

Página

RESUMO..... xi
ABSTRACT..... xii
LISTA DE ABREVIATURAS..... xiii
LISTA DE FIGURAS..... xiv
LISTA DE TABELAS..... xvi
I. INTRODUÇÃO..... 1
II. REVISÃO DE LITERATURA..... 3
2.1 Neoplasias mamárias em cadelas..... 3
2.2 Células dendríticas..... 5
2.1.1 Origem e tipos de células dendríticas..... 9
2.2.2 Processamento e apresentação antigênica..... 12
2.3 As células dendríticas e o tumor de mama..... 14
2.4 As células dendríticas e os mastócitos..... 15
III. OBJETIVOS..... 17
IV. MATERIAL E MÉTODOS..... 18
4.1 Grupos experimentais, colheita do material e classificação histológica. 18
4.2 Protocolos imuno-histoquímicos..... 20
4.3 Contagem das células imunomarcadas e dos mastócitos 23
4.4 Estudo de seguimento..... 24
4.5 Análise estatística..... 24
V. RESULTADOS..... 26
VI. DISCUSSAO..... 37
VII. CONCLUSÕES..... 44
VIII. REFERÊNCIAS..... 45
APÊNDICE..... 57
APÊNDICE 1..... 59
APÊNDICE 2 61

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 014526/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"O papel das células dendríticas na resposta imune aos tumores de mama em cadelas"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Rosemeri de Oliveira Vasconcelos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 03 de julho de 2012.

Jaboticabal, 03 de julho de 2012.

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

RELAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO E AS CÉLULAS DENDRÍTICAS NA RESPOSTA IMUNE AOS CARCINOMAS DO TIPO SIMPLES EM MAMA DE CADELAS

RESUMO – As células dendríticas despertam atualmente um grande interesse de estudos, pois são alvos primários da atividade tumoral sobre o sistema imune. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a relação entre o infiltrado inflamatório e as células dendríticas (DCs) nos carcinomas mamários do tipo simples em cadelas. Dois grupos de amostras foram formados, o primeiro composto por 18 amostras de tecido mamário sem alterações (grupo controle) e o segundo, de 26 carcinomas mamários do tipo simples (grupo tumor). Além disso, foram analisados 15 linfonodos provenientes das cadelas com tumor de mama e quatro linfonodos oriundos das cadelas sem tumor de mama. Foi realizada a imunodetecção de DCs mieloides imaturas e maduras, DCs plasmocitoides, linfócitos T, macrófagos e moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe II (MHC-II). Foram também identificados os mastócitos pela coloração especial de azul de toluidina. Para os linfonodos, realizou-se apenas a imunodetecção de DCs mieloides imaturas e maduras. A idade média das cadelas com tumor de mama foi de 9,3 anos (30%) e os cães sem raça definida (SRD) foram os mais afetados. Nenhum linfonodo apresentou focos de micrometástases. Das 17 cadelas acompanhadas para o estudo de seguimento, nove estão vivas e oito vieram a óbito. A causa de morte mais ocorrente foi a provocada por metástases (67%). Nas mamas com tumor, observou-se que os mastócitos e as DCs mieloides maduras apareciam nas regiões peritumorais. As DCs mieloides imaturas, as DCs plasmocitoides, os macrófagos e as células imunomarcadas para MHC-II foram visualizados somente no estroma tumoral. Já os linfócitos T foram encontrados nas porções tumoral e peritumoral. Nos linfonodos a marcação das DCs mieloides imaturas concentrou-se nos folículos linfoides e na zona paracortical; já as DCs maduras apareceram somente no centro dos folículos linfoides. Nas mamas controle, a quantidade de células inflamatórias, assim como as DCs foi ínfima. Houve diferença estatística significativa quando comparado os grupos controle e tumor para as DCs mieloides imaturas, DCs mieloides maduras, DCs plasmocitoides e macrófagos. Quanto aos linfócitos T, MHC-II e mastócitos, não foi observada diferença estatística quando comparado os grupos controle e tumor. A predominância de DCs imaturas no grupo tumor, possivelmente esteja relacionada com uma resposta imune ineficiente, favorecendo o desenvolvimento e a sobrevivência das células tumorais. A presença das DCs plasmocitóides no mesmo grupo seria indicativa de um pior prognóstico para cadelas com tumores de mama. Portanto, a diferenciação das células dendríticas caninas poderia ser influenciada pelas células neoplásicas e pelo microambiente tumoral. Estes efeitos parecem estender-se aos linfócitos T e aos macrófagos, que também foram predominantes no grupo tumor.

PALAVRAS-CHAVE: cão, células apresentadoras de antígeno, evasão imune, imuno-histoquímica, neoplasia de mama.

RELATIONSHIP BETWEEN THE INFLAMMATORY INFILTRATE AND THE DENDRITIC CELLS IN THE IMMUNE RESPONSE TO CARCINOMAS SIMPLE TYPE IN MAMMARY GLAND OF FEMALE DOGS

ABSTRACT - Dendritic cells currently represent a big focus of studies, because they're primary targets of tumor activity on the immune system. The main objective of this study was to evaluate the relationship between the inflammatory infiltrate and dendritic cells (DCs) in mammary carcinomas simple type in female's dogs. Two groups of mammary gland samples were formed, the first was composed of 18 mammary tissue samples unchanged (control group) and the second, with 26 mammary simple carcinomas (tumor group). In addition, 15 lymph nodes were analyzed from bitches with mammary gland tumor and four lymph nodes derived from bitches without mammary gland tumor. Immunodetection was performed to immature and mature myeloid DCs, plasmacytoid DCs, T cells, macrophages and molecules of the major histocompatibility complex class II (MHC -II). Mast cells have also been identified by the special staining toluidine blue. To lymph nodes, the immunodetection was performed only to immature and mature myeloid DCs. The average age of the bitches with mammary tumor was 9.3 years (30 %) and dogs without breed (SRD) were the most affected. No lymph node showed foci of micrometastases. From 17 bitches monitored for follow-up study, nine are alive and eight died. The cause of death more occurred was caused by metastasis (67%). In the mammary glands with tumor, it was observed that the mast cells and mature myeloid DCs appeared in peritumoral regions. The immature myeloid DCs, plasmacytoid DCs, macrophages and cells immunostained for MHC-II were seen only in the tumor stroma. The T cells were founded into the tumor and in peritumoral areas. Into the lymph nodes, the marking of immature myeloid DCs was concentrated in lymphoid follicles and paracortical zone; the mature DCs appeared only in the center of the lymphoid follicles. In mammary gland control, the number of inflammatory cells as well as DCs was minimal. Statistically significant difference was observed when the control group was compared with tumor group for immature myeloid DCs, mature myeloid DCs, plasmacytoid DCs and macrophages. As for T cells, mast cells and MHC-II, there was no statistical difference when compared tumor and control groups. The predominance of immature DCs in the tumor group is possibly related to an inefficient immune response, favoring the development and survival of tumor cells. The presence of plasmacytoid DCs in the same group would be indicative of a worse prognosis for female dogs with mammary tumors. Therefore, differentiation of dendritic cells could be influenced by canine tumor cells and the tumor microenvironment. These effects appear to extend to macrophages and T cells, which were also prevalent in tumor group.

KEY-WORDS: dog, antigen presenting cells, immune evasion, immunohistochemistry, mammary tumor.

LISTAS DE ABREVIATURAS

APCs – Células apresentadoras de antígeno

AT – Coloração de azul de toluidina

CD – *Cluster of differenciation*

CD3– Co-receptor de linfócitos T

CD11c – Integrina αX de membrana presente em células dendríticas imaturas

CD83 – Molécula co-estimulatória marcadora de superfície de células dendríticas maduras

IL-3Rα– Interleucina3 (CD123) alfa, marcador de superfície de células dendríticas plasmocitoides

DCs – Células dendríticas

CTLs – Linfócitos citotóxicos

IFN-1 – Intérferon tipo 1

FDCs – Células dendríticas foliculares

GM-CSF – Fator de estimulação de colônia de macrófagos e granulócitos

HE – Coloração de Hematoxilina e Eosina

IL-6 – Interleucina6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

MCs – Mastócitos

M-CSF – Fator de estimulação de colônia de macrófagos

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

MHC I – Complexo de histocompatibilidade principal de classe I

MHC II – Complexo de histocompatibilidade principal de classe II

NK – Células *natural killer*

SNK – Teste de Student Newman-Keuls

TAMs - macrófagos associados ao tumor

TH2 – Linfócito T *helper* 2

TLRs – Receptores *toll-like*

TGF-β – Fator de transformação do crescimento *beta*

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. As múltiplas e controversas as vias de diferenciação de DCs em humanos e camundongos, estabelecidas com base em evidências experimentais. Caixas sólidos e setas sólidas (pretas e verdes) indicam a existência comprovada das populações precursoras e vias de diferenciação. A caixa tracejada e as setas tracejadas (pretas e verdes) indicam a existência das mesmas, porém não comprovadas formalmente. Caixas vermelhas e setas vermelhas indicam a possível existência de precursores para essas populações e vias de diferenciação, respectivamente. (Adaptado de ARDAVÍN et al. 2001). No cão, estas relações ainda não foram discutidas formalmente..... 9

Figura 2. Esquema básico demonstrando a diferenciação das DCs quanto a sua origem e localização. (Adaptado de Pinã-Oviedo, Ortiz-Hidalgo, 2007)..... 10

Figura 3. Fotomicrografias das neoplasias mamárias malignas em cadelas. (A) Carcinoma tubular grau I, com evidente processo inflamatório no interstício tumoral (setas) (barra = 100 µm). (B) Carcinoma tubular grau II, com evidente aumento do número de células neoplásicas no interior dos túbulos (setas) (barra = 90 µm). (C) Carcinoma tubular grau III apresentando infiltrado inflamatório (setas) no interstício tumoral (barra = 60 µm). (D) Carcinoma papilar grau I com focos de infiltrado inflamatório focal (setas) no estroma tumoral (barra = 90 µm). Coloração de Hematoxilina e eosina..... 27

Figura 4. Fotomicrografias das neoplasias mamárias malignas em cadelas. (A) Carcinoma papilar grau II com evidentes formações papilares (setas). (barra = 90 µm). (B) Carcinoma sólido grau II. Notar figuras de mitose (setas) (barra = 60 µm). (C) Carcinoma sólido grau III em mama de cadela, com áreas de infiltrado inflamatório multifocal (setas) (barra = 60 µm). Coloração de Hematoxilina e eosina. (D) Infiltrado de mastócitos no estroma e no interior de um carcinoma papilar grau I (setas) (barra = 100 µm). Coloração de Azul de Toluidina..... 28

Figura 5. Fotomicrografia das imunomarcações em tecido mamário de cadelas. (A) Marcação de DCs mieloides imaturas em um carcinoma tubular grau I (barra = 50 µm). (B) Marcação das DCs mieloides maduras em região peritumoral de um carcinoma tubular grau III (barra = 100 µm) (no detalhe, uma DC madura no infiltrado inflamatório). (C) Marcação dos linfócitos T em um carcinoma tubular grau I (barra = 50 µm), (D) Marcação do MHC-II em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm). (E) Marcação de macrófagos em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm). (F) Marcação de DCs plasmocitoides em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm)..... 30

Figura 6. Médias e erros-padrões para a contagem dos mastócitos ($p<0,1319$) e das DCs mieloides imaturas ($p<0,0001$) e das DCs mieloides maduras, ($p<0,0198$) nos grupos controle e tumor nas mamas de cadelas. Teste Student Newman Keuls..... 31

Figura 7. Médias e erros-padrões para a contagem das marcações dos linfócitos T, (Teste Mann-Whitney, $p<0,0790$), do MHC-II, (Teste Student Newman Keuls, $p<0,0593$) do macrófago (Teste Mann-Whitney, $p<0,0472$), e das DCs plasmocitoides (Teste Student Newman Keuls, $p<0,0214$) nos grupos controle e tumor nas mamas de cadelas..... 32

Figura 8. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para a avaliar a correlação entre a quantidade de DCs plasmocitoides, tipo histológico e grau dos tumores de mama caninos dos grupos controle e tumor..... 34

Figura 9. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para o perfil celular (macrófagos, linfócitos, mastócitos e DCs imaturas e maduras), bem como para MHC-II e IL-3, em tecidos mamários caninos dos grupos controle e tumor..... 35

Figura 10. Fotomicrografias das imunomarcações em linfonodos inguinais de cadelas com tumor de mama e seus respectivos gráficos. (A) Marcação das DCs mieloides imaturas (anti-CD11c) concentrada no centro dos folículos linfoides e paracortical (barra = 100 µm). (B) Médias e erros-padrões das marcações das DCs mieloides imaturas (anti-CD11c, teste Mann-Whitney, $p<0,1567$) nos linfonodos dos grupos controle e tumor. (C) Marcação das DCs mieloide maduras (anti-CD83) localizada no centro dos folículos linfoides (barra = 100 µm). (D) Médias e erros-padrões das DCs mieloide maduras (anti-CD83, teste Student Newman Keuls, $p<0,0173$) nos linfonodos dos grupos controle e tumor..... 36

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Total de tumores de mama classificados pelo tipo histológico e graus de malignidade..... 19

Tabela 2. Anticorpos utilizados para a imunomarcação das células dendríticas, do infiltrado inflamatório e do MHC-II presente nas mamas com e sem neoplasia..... 20

Tabela 3. Especificação do tipo e tempo de recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação do anticorpo primário e respectivo substrato..... 23

Tabela 4. Presença de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em glândula mamária de cães acometidos ou não por tumor mamário..... 33

Tabela 5. Presença de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em relação ao tipo histológico dos tumores de mama caninos..... 33

Tabela 6. Médias, desvio padrão e erro padrão das contagens das células imunomarcadas dos respectivos anticorpos nos grupos controle e tumor..... 34

I. INTRODUÇÃO

O estudo da neoplasia mamária apresenta grande significado no âmbito da medicina veterinária devido a sua grande ocorrência na espécie animal, principalmente nas cadelas. A glândula mamária é alvo do desenvolvimento de tumores em virtude da variedade de tipos celulares existentes e potencialmente são susceptíveis de sofrerem mutações e originarem diferentes tipos de tumores. Dada a essa relevância, as neoformações em tecido mamário são continuamente estudadas, a fim de se compreender os mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como os meios de evasão deste tumor.

Apesar dos intensos esforços em estudar a relação entre o sistema imune e o câncer, a sua biologia ainda está longe de ser elucidada, pois existem inúmeros mecanismos de evasão tumoral que dificultam o sistema imune responder corretamente e eliminar o tumor. Um dos primeiros alvos de evasão imune dos tumores são as células dendríticas (DCs), que, uma vez inibidas de amadurecer, podem induzir a tolerância imunológica e prejudicar uma das suas principais funções, que é apresentar antígenos e ativar os linfócitos T.

As DCs são consideradas as mais eficientes apresentadoras de antígeno, pois funcionam como uma “ponte” entre as respostas imunes inata e a adquirida. São células multifuncionais, que atuam como sentinelas em praticamente todos os órgãos. Após a sua ativação, desencadeada pela resposta inflamatória ou pelo contato direto com patógenos, processam fragmentos antigênicos e então migram para os órgãos linfoides periféricos, onde atuarão como células apresentadoras de antígenos maduras para os linfócitos T.

Atualmente, as DCs se tornaram um grande alvo de pesquisas. Estão no foco de estudos para a confecção de vacinas antitumorais para pacientes humanos, uma vez que apresentam baixa toxicidade. Muitos projetos são fundamentados na pesquisa das DCs em diferentes tecidos e até mesmo em tumores de diversas espécies. Todavia, a detecção destas células ainda é prejudicada dada a escassez das mesmas *in vivo*. Ainda há a questão da ausência de marcadores específicos,

que prejudica ainda mais a compreensão do seu comportamento dentro dos diversos microambientes tumorais.

Em meio a toda essa busca pelo entendimento do papel das DCs, não há registros de estudos que relatem o verdadeiro papel destas células na resposta imune em cães com tumor de mama. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de células dendríticas nos tumores de mama em cadelas, por meio da técnica de imuno-histoquímica.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Neoplasia mamária em cadelas

A neoplasia mamária é comumente encontrada na rotina de médicos veterinários por todo o mundo, devido ao progressivo aumento no diagnóstico desta doença (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007). O tumor de mama é considerado o tipo de neoplasia mais diagnosticada em cadelas (MISDORP, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002; ZATLOUKAL et al., 2005; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007).

Não há predisposição racial, porém há um maior risco para animais de raças puras (DALECK et al., 1998) serem alvos do tumor de mama. As fêmeas caninas de meia idade a idosas são as mais acometidas e em mais de 50% dos casos as neoformações são malignas (QUEIROGA; LOPES, 2002; OLIVEIRA et al., 2003; ZATLOUKAL et al., 2005.; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias (torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais) (CARVALHO, 2006) e, aproximadamente 60% dos tumores ocorrem nas mamas inguinais (QUEIROGA; LOPES, 2002). A razão desta ocorrência ainda não é clara, mas pode estar relacionada ao maior volume das mamas inguinais e, consequentemente, à maior exposição ao estrógeno (MOULTON, 1990; CARVALHO, 2006).

A etiologia do tumor mamário canino, assim como de qualquer neoplasia, é multifatorial. Alterações genéticas, influências hormonais, nutricionais e ambientais já foram associadas ao surgimento de neoplasias nas mamas desta espécie (DE NARDI et al., 2002; MISDORP, 2002; TORÍBIO et al., 2012). A alimentação caseira composta por carnes de origem bovina e suína, assim como a obesidade no primeiro ano de vida são fatores que predispõe o surgimento do tumor. A relação com vírus ainda não foi totalmente elucidada, no entanto já foram detectadas partículas virais em células de tumor de mama de cadelas e gatas (ZATLOUKAL et al., 2005; CARVALHO, 2006).

A presença de receptores hormonais em alguns tipos de tumores de mama reforça a hipótese de que o crescimento tumoral em cães tem uma estreita relação com a presença de hormônios, como o estrógeno e a progesterona (CARVALHO, 2006; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007).

A não realização da castração precoce e o fornecimento de progestágenos exógenos podem influenciar no desenvolvimento de neoformações na glândula mamária, já que os hormônios agem como promotores e não iniciadores da neoplasia (FONSECA; DALECK, 2000; MARTINS; LOPES, 2005). A ovário-histerectomia é ainda a melhor forma de prevenção (DE NARDI et al., 2002; MISDORP, 2002; ZATLOUKAL et al., 2005; LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007). Quando realizada antes do primeiro estro, reduz o risco de desenvolvimento da neoplasia em 0,5%; após o primeiro cio, este risco aumenta significativamente para 8,0% e depois do segundo cio, o risco sobe para 26%. Após os dois anos e meio de idade, a proteção conferida pela castração desaparece (FONSECA; DALECK, 2000).

A primeira abordagem da cadela com nódulos mamários deve consistir na avaliação clínica (TORÍBIO et al., 2012) e exame físico minucioso, não apenas das glândulas mamárias, mas também de características gerais que possibilitem avaliar o estado geral do animal (FELICIANO et al., 2012).Todo aumento de volume no tecido mamário merece investigação a fim de descartar outros possíveis diagnósticos diferenciais, e moldar uma linha de tratamento correta a ser seguida (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001; CARVALHO, 2006).

Os elementos prognósticos são representados por sinais objetivos que permitem prever as características evolutivas do tumor e avaliar a resposta aos tratamentos (CARVALHO, 2006). Em medicina veterinária, existe um esforço crescente na tentativa de adicionar aos fatores prognósticos clássicos (tamanho do tumor, presença de ulceração cutânea, invasão ganglionar linfática), novos parâmetros de natureza molecular, que auxiliem a decisão clínica, à semelhança do verificado em medicina humana (QUEIROGA; LOPES, 2002).

O diagnóstico é realizado através da avaliação microscópica, por intermédio da citologia e histopatologia. A citologia possibilita avaliar o tipo celular e verificar sua origem, além de auxiliar no descarte de outras causas como mastite, lactação,

ou até mesmo outros tumores, como os de pele (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001). A análise histopatológica permite avaliar a arquitetura tecidual, inspecionar as margens cirúrgicas, observar características de malignidade e invasão (FELICIANO et al., 2012), assim como, verificar as adjacências que incluem linfonodos, vasos sanguíneos e linfáticos (MORRISON; De NICOLA, 1993).

A classificação histológica usada em medicina veterinária não é consensual. Têm sido utilizados diferentes sistemas para classificar microscopicamente as neoformações mamárias caninas, de forma a prever o seu comportamento (QUEIROGA; LOPES, 2002). A classificação estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tenta obter uma divisão de peso prognóstico e é tida como sendo a mais utilizada em todo o mundo, pois classifica os tumores de acordo com o seu potencial de malignidade (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007).

O mais recente consenso para classificação histológica das neoplasias mamárias caninas é o de Cassali et al. (2011), que se baseou em Misdorp et al. (1999) e que propôs alguns novos critérios, a fim de estabelecer um padrão para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da neoplasia mamária canina. Algumas alterações, como em relação aos carcinomas do tipo simples, foram realizadas. Ao considerar esse tipo de carcinoma, Misdorp et al. (1999) os subdividiu em túbulopapilíferos, sólidos e anaplásicos; já Cassali et al. (2011) classificou como carcinoma do tipo simples somente os tubulares, papilíferos e sólidos. A classificação mais atual foi adotada como referência neste estudo por se tratar de um consenso nacional e que teve por objetivo padronizar os critérios de avaliação deste tipo de neoplasia no Brasil.

2. 2 Células dendríticas

O interesse em investigar a relação entre o sistema imune, as células tumorais e seu microambiente é crescente e, a cada dia surgem novas pesquisas que buscam ilustrar os mecanismos envolvidos no complexo processo do escape tumoral. Para que um grupo de células neoplásicas seja eliminado é necessário que

haja o envolvimento das imunidades inata e adquirida, formando um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual diversas células e moléculas atuam mutuamente (MATIAS, 2010). Os principais componentes da imunidade inata incluem: barreiras físicas e químicas, fagócitos, células *natural killer* (NK) e citocinas. A resposta imune adaptativa é mediada pelos linfócitos T, que desenvolvem mecanismos efetores capazes de eliminar as células tumorais (ABBAS; LICHTMAN, 2007a; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010; CRUVINEL et al., 2010). Um dos processos de evasão do tumor é pela indução da tolerância imunológica, que favorece o desenvolvimento tumoral (KRATHWOHL; SCHACKER; ANDERSON, et al., 2006).

No século 20, os imunologistas ainda buscavam compreender a relação existente entre os antígenos e os linfócitos. A principal dúvida era compreender como o sistema imune conseguia iniciar uma resposta mediada por células, no momento em que o antígeno penetrava em um organismo. Somente em meados da década de 1960 foi que um terceiro elemento, denominado primariamente de “novel cells” (novas células) e posteriormente de células dendríticas (DCs), foi descrito e inserido neste contexto imunológico, elucidando melhor a relação antígeno-linfócitos (STEINMAN, 2012).

As DCs já haviam sido detectadas na pele humana graças à descrição feita por Paul Langerhans, no ano de 1868. No entanto, a sua função era totalmente desconhecida e somente na década de 70 que os pesquisadores Ralph Steinman e Zanvil Cohn identificaram essa “nova” população celular no baço de camundongos. Assim iniciaram os estudos com esta nova população de leucócitos. Portanto, a partir daí o papel das DCs na imunidade e seu potencial imunoterápico tem sido vastamente investigados (HART, 1997; MALDONADO-LÓPEZ; MOSER, 2001; JOLLES, 2002; WIEDER, 2003).

O interesse especulativo aumentou ainda mais quando foi comprovado que as DCs participavam do processo de rejeição aos transplantes de coração e rins realizados em humanos. Muitos foram os fatores que contribuíram para dificultar a compreensão das funções das DCs, tais como a escassez de marcadores específicos, a dificuldade em distingui-las de monócitos e macrófagos, bem como os problemas envolvendo a sua purificação. Porém os estudos persistiram, seguindo a corrente mais plausível de que as DCs pertencem a uma população rara de

leucócitos com complexa heterogeneidade fenotípica e funcional. São especializadas em processar e apresentar antígenos, dando início à resposta imune primária e secundária dos linfócitos T (HART, 1997; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; KAH-WAI et al., 2006).

Somente na década de 1980 que o conceito de que as DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais foi finalmente aceito. As DCs são altamente potentes em atuar na captura, processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T e B (WIEDER, 2003; KAH-WAI et al., 2006). Elas expressam elevado nível de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), moléculas co-estimulatórias e moléculas adesivas; um pré-requisito para a ativação de linfócitos T (KAH-WAI et al., 2006).

A ativação dos linfócitos T depende diretamente da intervenção das DCs, pois os linfócitos T só reconhecem um antígeno se este for apresentado por uma APC, diferente dos linfócitos B que são capazes de reconhecer diretamente antígenos através dos seus receptores. Por essa razão, as DCs são consideradas um ligante entre as imunidades inata e a adaptativa (CRUVINEL et al., 2010). Os receptores de antígenos presentes nos linfócitos T reconhecem os fragmentos de antígenos apresentados pelas DCs, ligados a moléculas de MHC, tanto de classe I quanto de classe II, as quais estimulam os linfócitos T citotóxicos (CTLs) e os linfócitos T *helper*, respectivamente (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Existem outras APCs, ou seja, células capazes de processar e apresentar antígenos, como os macrófagos e os próprios linfócitos B. Estas células podem ser encontradas na maioria dos tecidos, estando em maior número que as DCs dentro do organismo e são tão eficazes quanto elas em capturar, processar e apresentar fragmentos de antígeno (KAH-WAI et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2007a).

Acreditava-se que as DCs eram muito semelhantes fenotipicamente e funcionalmente aos monócitos e macrófagos, por terem morfologia e a capacidade de realizar fagocitose, além de serem originadas na medula óssea. De fato, as evidências geradas por diferentes abordagens experimentais suportaram esse conceito até o momento em que as DCs foram descritas como sendo uma nova população de leucócitos. No entanto, uma série de resultados gerados *in vivo* e *in vitro*, tanto em seres humanos como em camundongos, originou outro conceito, de

que as DCs podem ser formadas também a partir de precursores linfoides e não somente mieloides (ARDAVÍN et al., 2001; MALDONADO-LÓPEZ; MOSER, 2001).

Apesar dos cães serem utilizados em estudos com transplantes na medicina aliado ao crescente interesse na utilização de vacinas com DCs, apenas poucos ensaios clínicos foram realizados em cães até hoje. A principal causa se deve a falta de técnicas de padronizadas de isolamento, bem como, informações limitadas sobre o fenótipo e morfologia que caracterizem as DCs caninas *in vivo*. Por este fato, não há um marcador de superfície celular que seja expresso somente por elas (WIEDER, 2003; QESKAA, BAUMGÄRTNERA, BEINEKEA, 2013).

Para a análise de citometria de fluxo, um painel de diferentes anticorpos dirigidos contra moléculas de superfície (CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86, CD206, CD209, e TLR-3) já foi proposto para classificar as DCs caninas (WIEDER, 2003; QESKAA, BAUMGÄRTNERA, BEINEKEA, 2013). Em se tratando de análise imuno-histoquímica, mesmo para humanos, é necessário montar um grupo de anticorpos que expressem a presença e ausência de vários marcadores celulares. Em um estudo recente, verificou-se que as DCs caninas produzidas *in vitro* são classificadas como CD1c+ , CD11c+ , MHCII+ , CD80+ , CD86+ e CD40+. No entanto, ainda não foi descrito se o comportamento delas é o mesmo *in vivo*. (RICKLIN-GUTZWILLER et al., 2010)

Para humanos, os marcadores sugeridos para imuno-histoquímica incluem o MHC (classe II), marcadores de moléculas de adesão (como o CD1a, CD11c, CD50, CD54, CD58 e CD102) e ainda os marcadores de moléculas co-estimulatórias (como CD80, CD83 e CD86). Marcadores de linhagens celulares, como CD3 (linfócitos T), CD14 (monócitos), CD19 (linfócitos B), CD56 (células NK) e CD66b (granulócitos), não são expressos pelas DCs. Com uma grande variedade de marcadores de superfície disponível, o painel para a detecção de DCs pode tornar-se confuso e extenso. Na prática, a sua identificação por fenotipagem de superfície em tecidos com neoplasia pode ser conseguida demonstrando basicamente, marcação de MHC classe II, marcação de uma molécula de adesão, marcação de uma molécula co-estimulatórias, além de um marcador de linhagem que deve ser incluído a fim de diferenciar de outras células (WIEDER, 2003).

2.2.1 Origem e tipos de células dendríticas

As DCs representam um grupo de leucócitos muito diversificado. A sua heterogeneidade depende de populações precursoras, da localização anatômica, da função e do resultado final da resposta imune. Nos últimos anos muitas tentativas têm sido realizadas, a fim de classificar as subpopulações de DCs por análise fenotípica e funcional. Até o ano 2000 ainda não havia um modelo completo estabelecido para humanos (BANCHEREAU et al., 2000). Hoje, este modelo é bem estabelecido para humanos (LIU; NUSSENZWEIG, 2010) e para camundongos (ARDAVÍN et al. 2001 – Fig 1).

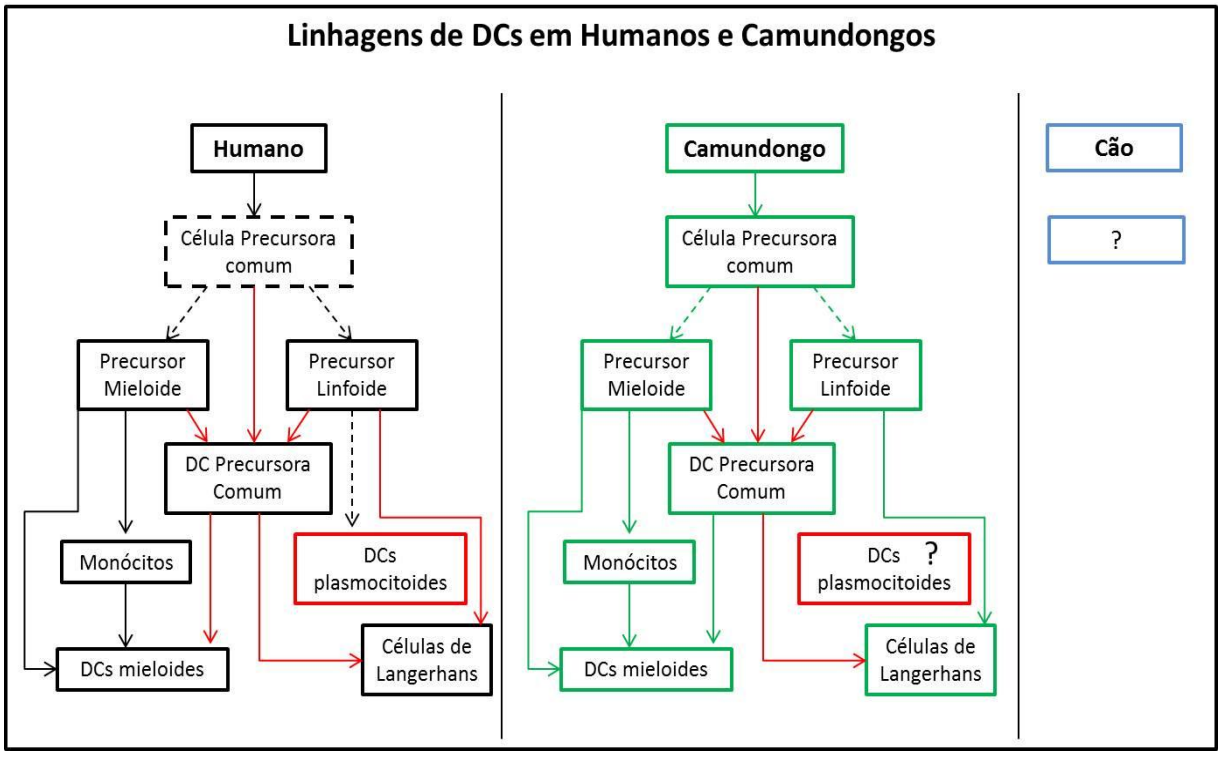


Figura 1. As múltiplas e controversas vias de diferenciação de DCs em humanos e camundongos, estabelecidas com base em evidências experimentais. Caixas sólidos e setas sólidas (pretas e verdes) indicam a existência comprovada das populações precursoras e vias de diferenciação. A caixa tracejada e as setas tracejadas (pretas e verdes) indicam a existência das mesmas, porém não comprovadas formalmente. Caixas vermelhas e setas vermelhas indicam a possível existência de precursores para essas populações e vias de diferenciação, respectivamente. (Adaptado de ARDAVÍN et al. 2001). No cão, estas relações ainda não foram discutidas formalmente.

As DCs podem ser classificadas de acordo com sua origem, sua localização anatômica (Fig 2) e seu estágio de maturação (BANCHEREAU et al., 2000). Deve-

se levar em conta o fato de que existem diferentes subpopulações, com características fenotípicas únicas e funcionais encontradas em diferentes locais (ARDAVÍN et al., 2001).

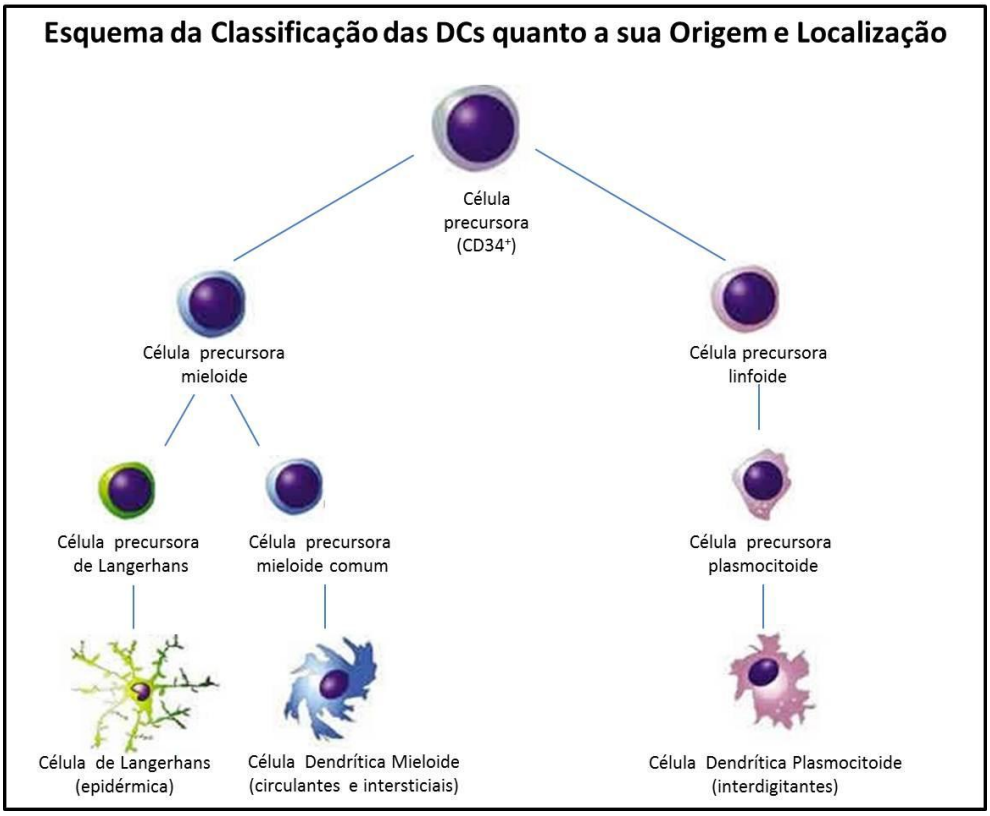


Figura 2. Esquema básico demonstrando a diferenciação das DCs quanto a sua origem e localização. (Adaptado de Pinã-Oviedo, Ortiz-Hidalgo, 2007).

Em humanos já foi estabelecido que as DCs são oriundas das células pluripotentes CD34+ presentes na medula óssea e se diferenciam em duas vias principais: a via mieloide e a via linfoide. Esta última aparece numa proporção menor no organismo, quando comparada à primeira (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; GOGOLÁK et al., 2003; CRUVINEL et al., 2010; MATIAS, 2010). Estas linhagens são diferenciadas pelo marcador mieloide CD11c. As DCs mieloides possuem marcação CD11c+/CD123-, enquanto as linfoides são CD11c-/CD123+ (PULENDRAN et al., 1999).

Notavelmente, as DCs mieloides e linfoides diferem não apenas nos seus marcadores fenotípicos, mas também nas suas propriedades funcionais. As mieloides são potentes APCs tipicamente associadas à ativação dos linfócitos T, além de iniciarem a resposta imunitária adaptativa, produzem citocinas e estimulam

a citotoxicidade das células NK. Por outro lado, as DCs da linhagem linfoide (plasmocitoides) são consideradas um subconjunto de células que se especializaram na produção de interferon tipo I (IFN) na estimulação por vários tipos de vírus. Em conformidade com seus papéis distintos na formação de uma resposta imune, as DCs mieloides e linfoides expressam um conjunto complementar, porém distinto de receptores *toll-like* (TLRs), indicando que respondem diferentemente aos patógenos (KALINSKI et al, 2005).

Quanto à sua localização, as DCs são classificadas em epidérmicas (células de Langerhans), circulantes (presentes na circulação sanguínea), intersticiais (presentes no interstício de órgãos não linfoides) e as interdigitantes (presentes nos órgão linfoides) (THOMAS; LIPSKY, 1996).

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

O terceiro tipo de maturação é observado apenas em situações patológicas. As DCs com fenótipo semi-maduro migram para os linfonodos e induzem tolerância nos linfócitos T, ao invés de imunidade. O amadurecimento completo requer tanto a presença de um antígeno quanto um sinal químico de “invasão”. A principal diferença entre as DCs semi-maduras das totalmente maduras é que apenas as maduras secretam citocinas (especialmente as interleucinas IL-12 e 6), que levam a promoção de uma resposta efetora de linfócitos T. Assim como acontece com as DCs imaturas, as interações entre as semi-maduras e os linfócitos T resultam no desenvolvimento de tolerância aos antígenos apresentados (KRATHWOHL; SCHACKER; ANDERSON, et al., 2006).

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

Existe ainda um último subtipo de DCs, as chamadas células dendríticas foliculares (FDCs), presentes nos linfonodos e que fazem parte do grupo de células que fornecem estrutura e estabilidade funcional para o microambiente nodal. As FDCs tem a capacidade de manter um antígeno por um longo período (de meses a anos) preso dentro de seus processos citoplasmáticos, que se entrelaçam para formar uma densa malha tridimensional. Sua origem não é hematopoiética, no entanto, supõe-se que sejam oriundas de células mesenquimais migratórias (REZK et al., 2012).

2.2.2 Processamento e apresentação antigênica

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T *in vivo* (KRATHWOHL et al., 2006). Os linfócitos T apresentam uma propriedade peculiar, denominada de restrição pelo MHC, que significa que eles só reconhecem um antígeno peptídico se estiver ligado pelas moléculas do MHC, presentes nas APCs. Somente desta maneira a resposta imunológica será iniciada (ABBAS; LICHTMAN, 2007b).

As precursoras das células dendríticas circulam no sangue na sua forma inativa para subsequentemente, darem origem as DCs imaturas que residem nos tecidos periféricos (KAH-WAI et al., 2006; WANG et al., 2007a). Perante um estímulo antigênico, as DCs deixam a medula óssea para chegarem ao local da injúria e se tornarem imaturas, onde passarão a apresentar grande capacidade de capturar/processar antígenos e baixa habilidade em estimular linfócitos T virgens (ABBAS; LICHTMAN, 2007b; MATIAS, 2010). Um aspecto curioso é que as DCs são

células que chegam muito rápido ao local de injúria, precedendo até mesmo os neutrófilos (CRUVINEL et al., 2010). Ao mesmo tempo, a presença do antígeno estimula as reações da imunidade inata e liga-se aos receptores TLRs das DCs, assim como das células epiteliais e macrófagos residentes no tecido doente. Tudo isto resulta na produção de citocinas e a sinalização direta do TLR, ativando as DCs que passam por diversas alterações fenotípicas e funcionais (GOGOLÁK et al., 2003; KAH-WAI et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2007b).

As DCs tornam-se ativadas e expressam receptores de superfície, que são específicos para quimiocinas produzidas na zona dos linfócitos T, dentro dos órgão linfoides. Tais quimiocinas direcionam as DCs a saírem do local da injúria e seguirem para os linfonodos, por meio dos vasos linfáticos. Durante essa migração, as DCs amadurecem, passando de células captadoras de antígenos para células estimuladoras de linfócitos T virgens. Com o amadurecimento há o aumento na síntese e na expressão estável de moléculas co-estimulatórias (como CD40, CD58, CD80 e CD86), necessárias para uma resposta completa das células T (ABBAS; LICHTMAN, 2007b; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os antígenos internalizados (microrganismo ou proteínas tumorais) são apresentados aos linfócitos T, associados a moléculas de MHC de classe II. Já os antígenos citosólicos (proteínas produzidas no citoplasma de células infectadas por vírus) são apresentados aos linfócitos T pelo MHC de classe I. Essas duas vias de processamento antigênico envolvem organelas e proteínas diferentes. São projetadas para capturar amostras de todas as proteínas presentes nos ambientes extracelular e intracelular. A segregação das vias de processamento também garantem que diferentes classes de linfócitos T reconheçam antígenos de compartimentos diferentes (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; ABBAS; LICHTMAN, 2007b).

Após os linfócitos T entrarem em contato com a células apresentadoras de antígeno, que carrearam o antígeno até o linfonodo, os linfócitos T tornam-se células efetoras. Em resposta a esse conjunto de reações, citocinas são liberadas para estimularem a produção de linfócitos T específicos para o antígeno (expansão clonal), que irá influenciar diversos grupos de células T. Uma parte destes linfócitos sofre processo de diferenciação de células T virgens em células T efetoras; outro

grupo de células T permanece no linfonodo, eliminando as células infectadas ou fornecendo sinais para os linfócitos B; algumas células T deixam o linfonodo e partem em direção ao local injuriado, onde são capazes de erradicar o antígeno; há ainda um outro grupo que -prolifera em resposta ao antígeno e se torna célula T de memória. O estímulo de diferenciação dos linfócitos cessa após a eliminação completa do agente agressor (ABBAS; LICHTMAN, 2007b).

2.3 As células dendríticas e o tumor de mama

O sistema imunológico reage de diversas formas frente aos diferentes tipos de neoplasias. Alguns antígenos tumorais podem ser fracamente imunogênicos, o que enfraquece as funções do sistema imune. Nessas condições, o sistema de defesa não consegue trabalhar corretamente e acaba por ser suplantado pelo tumor. Acredita-se que a falha funcional das células dendríticas seja um dos principais fatores que levam ao escape tumoral (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

A produção de fatores derivados do tumor pode induzir a falha das DCs, afetando a diferenciação destas e seus processos de maturação. Muitas citocinas derivadas de tumores, que possuem atividade imunossupressora, podem impedir o desenvolvimento de DCs totalmente maduras, como é o caso do VEGF (fator de crescimento derivado do endotélio vascular), M-CSF fator estimulador de colônias de macrófagos), IL-6, GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos), IL-10, gangliosideos e TGF-β (fator de transformação e crescimento) (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

A maturação de uma DC é um ponto de controle na iniciação da resposta imunológica. As DCs semi-maduras desempenham um papel significativo na tolerância imunológica, através da indução de resposta de Th2. Como uma consequência da maturação de células dendríticas defeituosas, há uma diminuição de DCs maduras e funcionalmente competentes e um aumento de DCs imaturas. A diminuição do número de DCs maduras faz com que haja uma incapacidade de iniciar uma resposta imunitária específica contra o tumor, enquanto que um maior

número de DCs imaturas funcionalmente incompetentes induz a tolerância dos linfócitos T. Como consequência, ocorre o escape tumoral da vigilância das DCs (GABRILOVICH, 2004; KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

Estudos recentes em humanos com câncer de pulmão e de mama indicaram uma diminuição significativa nas populações de DCs maduras. As DCs do sangue periférico desses pacientes expressaram níveis inferiores de MHC II e de moléculas co-estimulatórias, o que indicou falha na ativação das DCs. O entendimento da relação dos defeitos das DCs com a progressão de tumores é clinicamente importante. Embora muitos estudos tenham sido realizados para definir os mecanismos que causam defeitos nas DCs no câncer, há muitos tipos de tumores em que esses mecanismos moleculares ainda não foram totalmente definidos (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

Estudos anteriores mostraram que as DCs imaturas conseguem se infiltrar no interior de carcinomas primários de mama em mulheres, e as DCs maduras ficaram restritas apenas a periferia tumoral. Isso pode indicar que fatores estromais podem determinar a adesão das DCs, uma vez que DCs maduras só são observadas em órgãos linfoides (BELL et al., 1999). Já a infiltração de DCs plasmocitoides em tumores mamários de mulheres já foi relacionada a baixa sobrevida das pacientes, sugerindo uma contribuição destas células na progressão tumoral (TREILLEUX et al., 2004).

2.4 As células dendríticas e os mastócitos

A capacidade de integrar os sinais derivados de patógenos invasores com estímulos vindos de células vizinhas é uma característica muito importante das DCs que lhes permitem regular e afinar a resposta imune adquirida contra os antígenos. As DCs interagem e recebem sinais a partir de várias células do sistema imune, como os mastócitos, neutrófilos, células NK, além das células epiteliais, queratinócitos e células do estroma que servem como reguladores importantes de funções das DCs (MAZZONI et al., 2013).

Os mastócitos (MCs) são amplamente distribuídos entre os tecidos dos mamíferos, onde liberam significativas quantidades de mediadores pró-inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento. Eles se acumulam em sítios de crescimento neoplásico em resposta a vários quimioatrativos derivados dos tumores, que impedem a degranulação mastocitária (THEOHARIDES; CONTI, 2004). Por esta razão, os mastócitos são considerados um dos possíveis coadjuvantes do desenvolvimento tumoral (THEOHARIDES; CONTI, 2004). Desta forma, os tumores podem controlar as atividades mastocitárias, dentre elas a atração de DCs imaturas para o foco neoplásico (BACCI; PIMPINELLI; ROMAGNOLI, 2010). Essa tendência dos mastócitos se acumularem em torno da área tumoral é visto por alguns estudiosos como uma tentativa para se opor à progressão da população celular anormal (ROVERE et al., 2007).

Cada vez mais surgem dúvidas sobre o envolvimento dos MCs no crescimento dos tumores, dado ao grande número dessas células terem sido detectadas em carcinomas mamários de mulheres, nas fases iniciais. Há discussão sobre se a presença dos MCs seja um sinal de bom prognóstico, como já foi descrito em tumores de mama em mulheres (DABIRI et al., 2004) e em carcinomas gástricos em humanos (JIANG et al., 2002; HEIDARPOUR et al., 2007). Na veterinária, a presença dos mastócitos já foi relacionada a mau prognóstico no tumor de mama em cadelas, por estimularem a angiogênese tumoral (LAVALLE et al., 2010). Enquanto na literatura médica vem se acumulando fortes evidências sobre a atividade dos MCs na oncogênese humana, até o momento existem poucos relatos veterinários focalizando o assunto (SFACTERIA et al., 2011).

Estudos anteriores mostram que há uma relação direta entre os mastócitos e as DCs, no que se refere à maturação das últimas. Os MCs podem auxiliar na maturação das DCs, com o aumento de moléculas co-estimulatórias circulantes (DUDECK et al., 2011). Todavia, estudos relacionando as DCs e os mastócitos em tumores de mama em cadelas são escassos, fato esse que estimulou a análise dos dois tipos celulares nesse microambiente tumoral. A busca da compreensão da relação destes achados com a agressividade dos carcinomas mamários tem o intuito de esclarecer melhor a complexa biologia tumoral, bem como, identificar possíveis mecanismos de escape imune envolvendo DCs e/ou MCs.

III. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a relação entre diferentes subpopulações de células dendríticas e o infiltrado inflamatório nos carcinomas do tipo simples em mamas de cadelas.

Os objetivos específicos foram:

- Determinar a densidade de DCs mieloides imaturas e maduras, por meio de imuno-histoquímica, nos tumores de mama malignos;
- Verificar a imunodetecção de DCs imaturas e maduras nos linfonodos inguinais das cadelas com tumor e sem tumor de mama;
- Determinar a densidade de células do infiltrado inflamatório tumoral predominante (linfócitos, macrófagos e mastócitos) nos tumores de mama malignos;
- Verificar a associação entre a presença de mastócitos e de DCs mieloides nos tumores de mama;
- Determinar a imunodetecção do receptor IL-3Rα (DCs plasmocitóides), nos tumores mamários caninos e nas mamas sem tumor e verificar se existe relação com mau prognóstico.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais, colheita do material e classificação histológica

As amostras de neoplasia mamária utilizadas neste estudo foram provenientes de 21 cadelas atendidas pelo Serviço de Oncologia Veterinária, juntamente ao Serviço de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, no período de 2011 a 2012. Destes animais foram selecionadas amostras de tumor de mama, que se enquadraram dentro do tipo histológico proposto (carcinoma mamário do tipo simples) e avaliados por histopatologia e imuno-histoquímica. Os linfonodos inguinais provenientes destas mesmas cadelas com tumor (n=15), também foram analisados por histopatologia e imuno-histoquímica. Além disso, amostras de glândulas mamária hígidas foram obtidas de 12 fêmeas caninas necropsiadas no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal, SP, juntamente com linfonodos inguinais (n=4) foram analisados por histopatologia e imuno-histoquímica. Foram utilizados mais de um tumor proveniente de uma mesma cadela, assim como mais de uma mama controle proveniente de uma mesma cadela.

As amostras de tecido mamário utilizadas neste estudo foram separadas em dois grupos: grupo controle (formado pelas mamas sem neoplasia, totalizando 18 amostras) e grupo tumor (mamas com carcinoma do tipo simples, totalizando 26 amostras). Para todos os grupos não houve qualquer predileção por raça ou idade.

Os animais passaram por triagem clínica e eram encaminhados para o procedimento cirúrgico (mastectomia radical unilateral), sob anestesia geral inalatória. Durante o procedimento cirúrgico era aplicado um questionário com os proprietários das cadelas com tumor de mama, a fim de obter mais informações sobre a vida, comportamento e as alterações provocadas pela neoformação no animal (Apêndice 1).

No momento da colheita dos tumores de mama, uma parte foi separada para fixação em formol (10% tamponado com fosfatos, pH 7,4) e a outra parte foi

congelada. Para a congelação, os fragmentos foram imersos em solução crioprotetora de N-hexano (Synth), congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C, onde permaneceram até serem cortados em micrótomo de congelação. Os cortes foram armazenados em freezer -20ºC até a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Os fragmentos de tumor fixados em formol permaneceram nessa solução por 24 horas. Após esse período, eram armazenados em álcool 70%, para posteriormente serem processados, incluídos em parafina, cortados em micrótomo na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Todo o processamento histológico foi realizado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

Todas as amostras do grupo tumor utilizadas nesse trabalho foram classificadas de acordo com o descrito no consenso para diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores mamários caninos (CASSALI et al., 2011) em: carcinomas tubulares, carcinomas papilares e carcinomas sólidos (Tabela 1) e o grau de malignidade foi baseado em Elston e Elis (1998) (apêndice 2).

Tabela 1. Total de tumores de mama classificados pelo tipo histológico e graus de malignidade.

Tipo Histológico	Grau	Total
Carcinoma tubular	1	11
	2	3
	3	3
Carcinoma papilar	1	4
	2	2
Carcinoma sólido	2	1
	3	2
TOTAL		26

Para a determinação do grau de malignidade dos tumores levou-se em consideração o grau de diferenciação tubular, pleomorfismo e número de mitoses. Outros padrões como densidade celular, dimensão do tumor, encapsulamento, além de padrões celulares como anisocariose, anisocitose, cariomegalia, invasão vascular e invasão da cápsula. Necrose, hemorragia, inflamação, mineralização também foram considerados para a aplicação do grau de malignidade.

Durante a classificação histológica dos tumores avaliou-se também o tipo de infiltrado inflamatório presente intra/peritumoral. A presença dos mastócitos associados ao tumor foi avaliada por meio da coloração de azul de toluidina (AT).

4.2 Protocolos imuno-histoquímicos

Para as análises imuno-histoquímicas foram utilizados os anticorpos CD11c (WANG et al., 2007b; RICKLIN-GUTZWILLER et al, 2010; QESKA, BAUMGÄRTNER, BEINEKE, 2013), CD83 (WANG et al., 2007b; QESKA, BAUMGÄRTNER, BEINEKE, 2013), CD123 (DELLA BELLA et al., 2003; TREILLEUX et al., 2004), CD3 (KARPUS, 2007) e MHC-II (WANG et al., 2007b; QESKA, BAUMGÄRTNER, BEINEKE, 2013) e macrófago (ZENG et al., 1996) em todos os cortes de mama, incluídos em parafina ou congelados, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 2. Anticorpos utilizados para a imunomarcação das células dendríticas, do infiltrado inflamatório e do MHC-II presentes nas mamas de cadelas com e sem neoplasia.

Anticorpos	Clones	Tipo celular marcado	Marca
CD11c (mouse anti-dog, monoclonal)	CA11.6A1	DCs mieloides imaturas	ABD Serotec (ref. MCA1778S)
CD83 (mouse anti-human, monoclonal)	1H4b	DCs mieloides maduras	Abcam (ref. ab49324)
CD123 (rabbit anti-human, policlonal)	Policlonal	DCs plasmocitoides	Abcam (ref. ab154402)
CD3 (rabbit anti-human, monoclonal)	F7.2.38	Linfócitos pan T	Dako (ref. M7254)
Anti-HLA-DR (mouse anti-human, monoclonal)	TAL.1B5	MHC-II	Dako (ref. M0746)
Anti-macrófago (mouse anti-human monoclonal)	MAC387	Macrófagos	Abcam (ref. ab22506)

O protocolo de imuno-histoquímica utilizado para o material emblocado em parafina foi (marcação das DCs mieloides maduras, DCs plasmocitoides, linfócito T, do MHC-II e macrófagos):

- Desparafinização dos cortes de mamas e linfonodos em estufa a 60ºC, por uma hora;
- Hidratadação dos cortes em soluções decrescentes de xilol e álcool seguido de 10 banhos em água destilada;
- Recuperação antigênica (Tabela 4). Após a recuperação, os cortes ficavam resfriando por 20 minutos;
- Bloqueio da peroxidase endógena (8%), por 30 minutos, em câmara escura, seguido de duas lavagens com Tris HCL (pH 7,4) e mais duas lavagens com água destilada (cinco minutos cada);
- Bloqueio das reações (proteínas) inespecíficas (Protein Block serum-free, DAKO, ref. X0909), por 30 min, em câmara úmida e em temperatura ambiente seguido de três lavagens com TRIS HCL (pH7,4), por cinco minutos;
- Incubação do anticorpo primário a 4°C, por 18 horas, em câmara úmida (visualizar as respectivas diluições na Tabela 4);
- Lavagem em solução de TRIS HCL (pH 7,4) por cinco minutos e aplicação do substrato (Tabela 4). Para o CD83, CD3 e MAC387 foi utilizado o Complexo de Polímeros ligados a Peroxidase (Kit Advance^{TM}, DAKO, cod. K4067) com incubação do HRP-link por 30 minutos, seguido da aplicação do polímero, por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Para o CD123, utilizou-se o substrato o HRP-Polymer Kit (kit MACH-4 Universal, Biocare, cod. M4BD53-4 G, H, L), com incubação por 30 minutos do link, em temperatura ambiente, seguido da incubação do polímero, por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Para a marcação dos macrófagos, foi utilizado como substrato o HRP-link (Kit Dako EnVision^{TM}, cod.K5355), à temperatura ambiente, por uma hora. Em seguida, os cortes foram lavados com TRIS HCL (pH 7,4), por cinco minutos;
- Para a visualização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina, Dako, cód. K3468-1), durante três minutos, seguido da imersão dos cortes em água deionizada;

- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris, por 30 segundos, seguido de lavagem em água correten, por 10 minutos;
- Desidratação em álcoois em concentrações crescentes, seguido de xilol e montagem das lâminas com Permount (Fisher Scientific, cod. S70104).

O protocolo imuno-histoquímico utilizado para os cortes congelados (marcação das DCs mieloides imaturas) teve algumas diferenças do já descrito, que foram:

- O material foi cortado na espessura de 5µm, em criostato (Minotome – Damon/IEC Division), sob temperatura de 4°C, onde eram depositados em lâminas polarizadas (StarFrost® Green, Sakura). Os cortes foram armazenados em freezer a -20°C até a realização da técnica de imuno-histoquímica.
- As lâminas eram retiradas do freezer e deixadas secar, por cinco minutos em temperatura ambiente, onde em seguida eram fixadas em acetona gelada, na temperatura de -20°C, por 10 minutos.
- Secagem dos cortes por 30 minutos seguido de três banhos em solução de Tris HCL (pH 7,4), por cinco minutos cada.
- Bloqueio das proteínas inespecíficas (Protein Block serum-free, DAKO, ref. X0909), por 30 minutos, seguido de uma lavagem com solução de Tris HCL, por mais cinco minutos.
- Incubação do anticorpo primário (Tabela 4), em câmara úmida, a 4°C, por 18 horas. Seguiu-se lavagem com solução de Tris HCL por cinco minutos.
- Bloqueio da peroxidase (8%, por 30 min, em câmara escura, em temperatura ambiente).
- Aplicação do HRP-link (Kit Advance™, DAKO, cod. K4067.) em temperatura ambiente, por 30 minutos seguido da aplicação do polímero, por mais 30 minutos, em temperatura ambiente. Os passos seguintes foram exatamente iguais ao determinado no protocolo para cortes parafinados.

Tabela 3. Especificação do tipo e tempo de recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação do anticorpo primário e respectivo substrato.

Anticorpo primário	Recuperação antigênica	Tempo**	Diluição***	Substrato
CD11c*	-	-	1:900	Advance (dako)
CD83	Banho-Maria 97°C	30 min	1:100	Advance (Dako)
CD123	Panela a vapor (Pascal, DAKO)	30 min	1:400	Mach-4 (Biocare)
CD3	Banho-Maria 97°C	30 min	1:150	Advance (Dako)
HLA-DR	Banho-Maria 97°C	30 min	1:500	Advance (Dako)
MAC387	Panela a vapor (Pascal, DAKO)	30 min	1:4000	Envision (Dako)

* Corte congelado. ** Tempo de incubação na recuperação antigênica = 30 minutos (exceto para o anticorpo CD11c). ***Tempo de incubação dos anticorpos 1º = 18 horas.

Os tecidos controles positivos utilizados para os anticorpos CD123, CD83, CD3 e HLA-DR foram os recomendados pelo fabricante. Para o anticorpo CD11c foi utilizado como controle positivo a tonsila canina. Para o MAC387 utilizou-se baço de cão. Como controle negativo utilizou-se o diluente de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Dako, cod. S3022) em substituição ao anticorpo primário, para todos os testes.

4.3 Contagem das células imunomarcadas e dos mastócitos

A contagem das células imunomarcadas e das células coradas com AT foi realizada em microscópio de luz com equipamento para fotomicrografia digital (Nikon E200). Para a quantificação foram escolhidos, aleatoriamente, cinco campos, onde foi contabilizado o número total de células marcadas, na objetiva de 40x, em uma área medindo 0,19625 mm^2.

Para avaliação dos cortes de glândula mamária, foram realizadas as contagens das DCs imaturas, DCs maduras, DCs plasmocitoides, macrófagos,

linfócitos T, MHC-II e mastócitos, tanto do grupo controle quanto no grupo tumor. Para a avaliação dos linfonodos, foram realizadas as marcação para as DCs imaturas e maduras, tanto nos grupos controle quanto no grupo tumor.

4.4 Estudo de seguimento (follow-up)

Foi realizado ainda um estudo de corte, do tipo follow-up, sendo as cadelas deste experimento acompanhadas por um período médio de um no e meio após a realização da mastectomia, a fim de obter informações sobre estado de saúde, possíveis evidências de recidivas ou mesmo, de metástase. Das 21 cadelas com tumor de mama que participaram deste estudo, em quatro não foram obtidas informações. Portanto, 17 cadelas foram acompanhadas durante um ano e meio pós-mastectomia.

4.5 Análise estatística

Para análise estatística realizou-se a análise de variância (ANOVA) a fim de comparar a imunomarcação mamária para DCs mieloide imaturas (anti-CD11c), DCs mieloide maduras (anti-CD83), DCs plasmocitoides (anti-CD123), MHC-II (anti-HLA-DR), linfócitos T (anti-CD3), macrófagos (anti-MAC387) e mastócitos (coloração de AT) e em linfonodos para DCs imaturas e maduras. Para as pressuposições do Anova foram realizados os testes de Brown-Forshyte, para homocedasticidade, e Cramer von Mises para normalidade dos erros. Quando satisfeitas as pressuposições, o teste de Student Newman Keuls (SNK) foi utilizado para comparação das médias. Quando não satisfeitas, foram realizadas as transformações de dados segundo Bartlett (1947) e, então, submetidas ao SNK. Quando as transformações não satisfizeram as pressuposições foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabelas de contingência foram utilizadas para analisar a frequência da presença de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em animais acometidos ou não por tumores mamários, onde a presença de DCs plasmocitoides foi determinada como 0 (para ausência) e 1 (para presença) de marcação positiva. Uma segunda tabela de contingência foi construída a fim de relacionar a presença da imunomarcação de DCs plasmocitoides com o tipo histológico do tumor. Para o tipo histológico, a tabela foi categorizada com os seguintes índices: 1) controles; 2) papiliares; 3) tubulares; e 4) sólidos. Para analisar a independência das variáveis foi realizado o teste exato de Fisher. A determinação do coeficiente de correlação de Spearman foi utilizada para determinar a relação entre o tipo histológico do tumor, a gradação histológica do tumor e a quantidade de imunomarcação de DCs plasmocitoides (CD123).

A definição do coeficiente de correlação de Spearman foi realizada também para as DCs imaturas, MHC-II, linfócitos T, DCs maduras, DCs plasmocitoides, macrófagos e mastócitos.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Para todas as análises foi considerado $\alpha=5\%$.

Quanto ao grau de malignidade dos tumores, estes não foram considerados na análise de variância, pois não houve números representativos de todos os graus quando separados em grupos.

V. RESULTADOS

Os tumores foram classificados em carcinomas do tipo simples, padrões tubular, papilar e sólido (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, 4A, 4B e 4C). No presente estudo, dados com raça predominante e idade mais acometida foram considerados apenas nas cadelas do grupo tumor. A idade média das cadelas com tumor de mama foi de 9,3 anos (30%) e foi predominante em cães sem raça definida (SRD) (43%). Nenhum linfonodo apresentou focos de micrometástases.

Em relação à avaliação macroscópica dos tumores, de um total de 26 amostras, a média de tamanho dos nódulos foi de três centímetros. Destes, 19 tumores eram firmes e maciços e sete eram císticos e macios. A coloração interna dos tumores variou de brancacenta, pardacenta a enegrecida. Os linfonodos tiveram tamanho médio de 1,0 cm do grupo tumor e sua coloração variou de acastanhada a enegrecida.

Das 17 cadelas acompanhadas para o follow-up, nove estão vivas (53%) e oito morreram (47%). As causas de óbitos incluem: atropelamento (n=2) e parada cardíaca (n=1), totalizando 33%, bem como, a metástase representando 67% e correspondendo a maior causa de óbito nas cadelas. Os locais onde as metástases foram identificadas foram cavidade oral, pulmão e vesícula urinária.

Na coloração pelo AT, observou-se infiltração de mastócitos no estroma tumoral (Figura 4D). Não foi verificada diferença significativa ($p<0,1319$, Teste SNK), entre os grupos controle e tumores, com média pouco maior no grupo tumores (Figura 6).

Durante a avaliação em microscopia de luz foi possível observar que os tumores de mama deste estudo apresentaram focos de infiltrado inflamatório de origem mononuclear, composto principalmente de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Ainda notou-se a dificuldade em observar as DCs somente com coloração de HE, por serem semelhantes com os macrófagos. As DCs mieloides imaturas apresentam poucos dendritos citoplasmáticos, citoplasma moderado, núcleo arredondado. Não foi possível identificar as DCs mieloides maduras e as DCs plasmocitoides na coloração de HE.

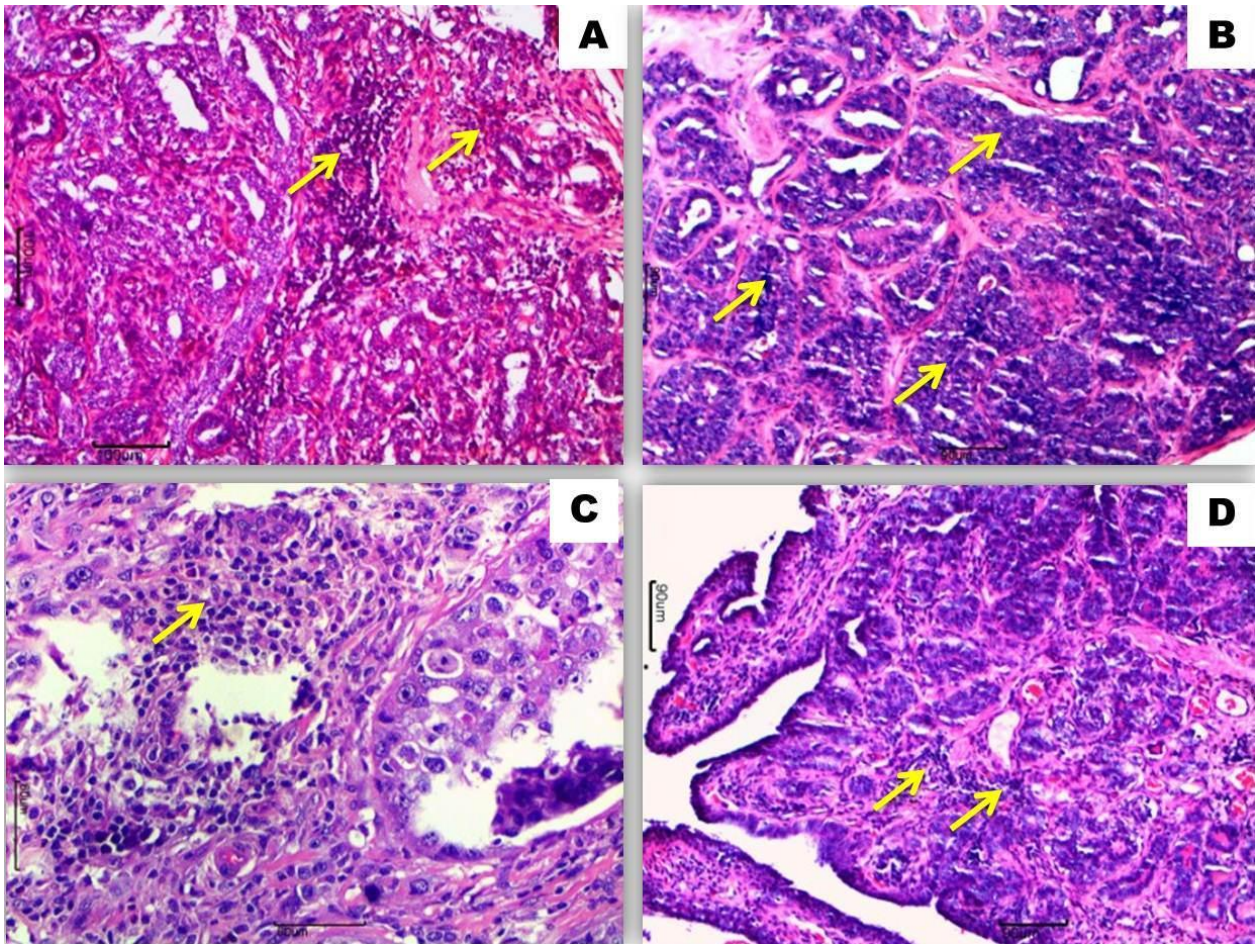


Figura 3. Fotomicrografias das neoplasias mamárias malignas em cadelas. (A) Carcinoma tubular grau I, com evidente processo inflamatório multifocalno interstício tumoral (setas) (barra = 100 µm). (B) Carcinoma tubular grau II, com evidente aumento do número de células neoplásicas no interior dos túbulos (setas) (barra = 90 µm). (C) Carcinoma tubular grau III apresentando infiltrado inflamatório focal (setas) no interstício tumoral (barra = 60 µm). (D) Carcinoma papilar grau I com focos de infiltrado inflamatório (setas) no estroma tumoral (barra = 90 µm). Coloração de Hematoxilina e eosina.

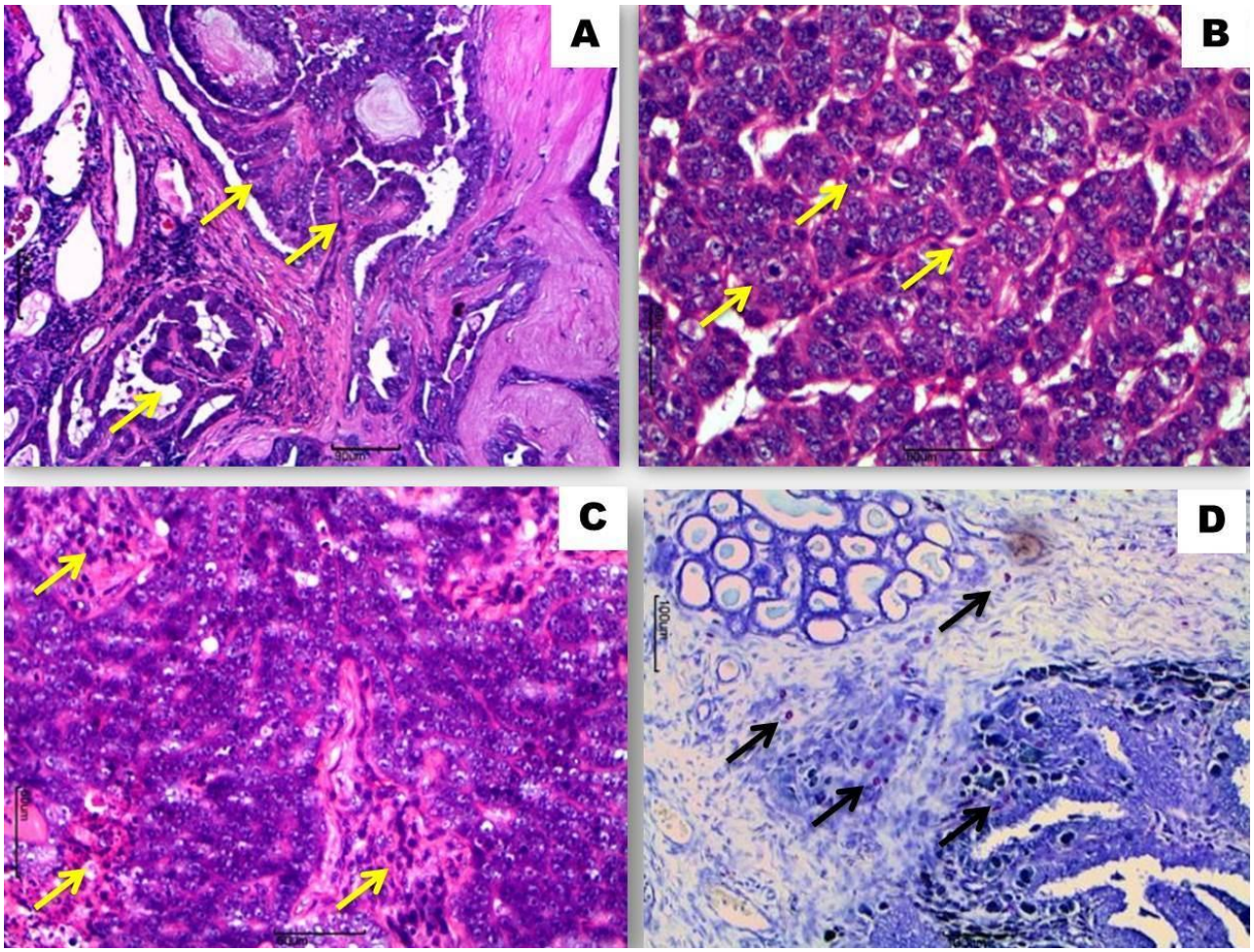


Figura 4. Fotomicrografias das neoplasias mamárias malignas em cadelas. (A) Carcinoma papilar grau II com evidentes formações papilares (setas). (barra = 90 µm). (B) Carcinoma sólido grau II. Notar figuras de mitose (setas) (barra = 60 µm). (C) Carcinoma sólido grau III em mama de cadela, com áreas de infiltrado inflamatório multifocal (setas) (barra = 60 µm). Coloração de Hematoxilina e eosina. (D) Infiltrado de mastócitos no estroma e no interior de um carcinoma papilar grau I (setas) (barra = 100 µm). Coloração de Azul de Toluidina.

A imunomarcação das DCs mieloides imaturas (anticorpo CD11c) foi citoplasmática. As células com marcação positiva foram observadas principalmente em meio às células tumorais e, raramente fora do sítio tumoral (Figura 5A). Verificou-se diferença significativa ($p<0,0001$, Teste SNK) para a marcação do anticorpo anti-CD11c entre os grupos controle e tumor, com maior média no grupo tumor (Figura 6).

A imunomarcação de DCs mieloides maduras (anticorpo CD83) foi citoplasmática, em grande parte localizada em meio ao estroma tumoral e raras vezes fora do sítio tumoral (Figura 5B). A comparação entre os grupos controle e tumor mostrou diferença significativa ($p<0,00198$, Teste SNK), com maior média no grupo tumor (Figura 6).

A marcação dos linfócitos T (anticorpo CD3) foi em membrana plasmática, localizada no infiltrado inflamatório, distribuído em meio ao estroma tumoral (Figura 5C). Não foi verificada diferença significativa ($p<0,0790$, Teste de Mann-Whitney) entre os grupos controle e tumor (Figura 7).

A detecção de MHC-II (anticorpo HLA-DR) foi citoplasmática. Neste caso, a marcação estava nos ácinos mamários, nas células tumorais e no infiltrado inflamatório, composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Figura 5D). Não foi verificada diferença significativa ($p<0,0593$, Teste SNK), entre os grupos controle e tumor (Figura 7).

Para os macrófagos (anticorpo MAC387), a marcação mostrou-se no núcleo e citoplasma, sendo observada no estroma tumoral e no infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 5E). Verificou-se diferença significativa ($p<0,0472$, Teste de Mann-Whitney) entre os grupos controle e tumor, com maior média neste último (Figura 7).

A marcação das DCs plasmocitoides (anticorpo CD123) foi citoplasmática e as células localizavam-se em meio às células tumorais e do infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figura 5F). Diferença significativa ($p<0,0214$, Teste SNK) foi verificada entre os grupos controle e tumor, com maior média no grupo tumor (Figura 7).

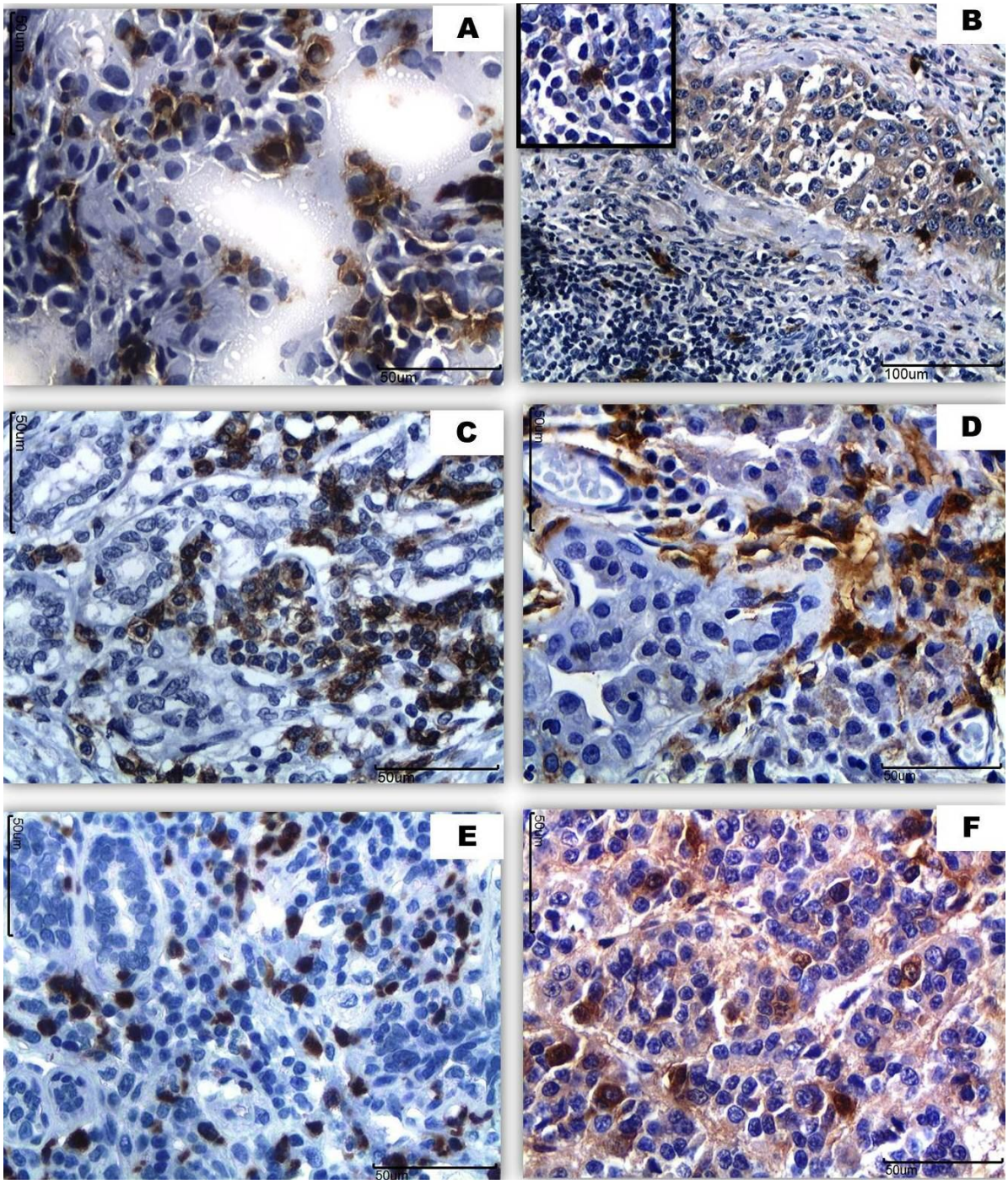


Figura 5. Fotomicrografia das imunomarcações em tecido mamário de cadelas. (A) Marcação de DCs mieloides imaturas em um carcinoma tubular grau I (barra = 50 µm). (B) Marcação das DCs mieloides maduras em região peritumoral de um carcinoma tubular grau III (barra = 100 µm) (no detalhe, uma DC madura no infiltrado inflamatório). (C) Marcação dos linfócitos T em um carcinoma tubular grau I (barra = 50 µm), (D) Marcação do MHC-II em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm). (E) Marcação de macrófagos em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm). (F) Marcação de DCs plasmocitoides em um carcinoma tubular grau III (barra = 50 µm).

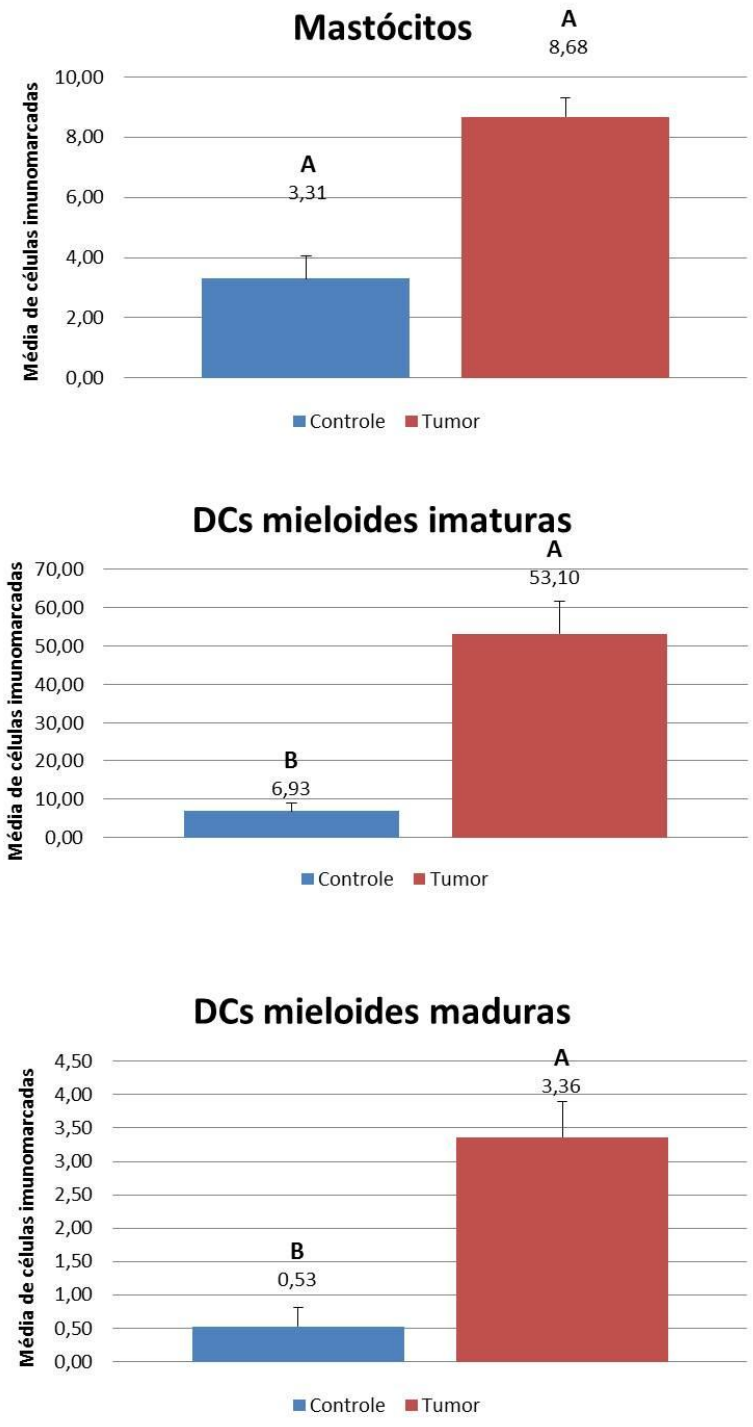


Figura 6. Médias e erros-padrões para a contagem dos mastócitos (p<0,1319) e das DCs mieloides imaturas (p<0,0001) e das DCs mieloides maduras, (p<0,0198) nos grupos controle e tumor nas mamas de cadelas. Teste Student Newman Keuls.

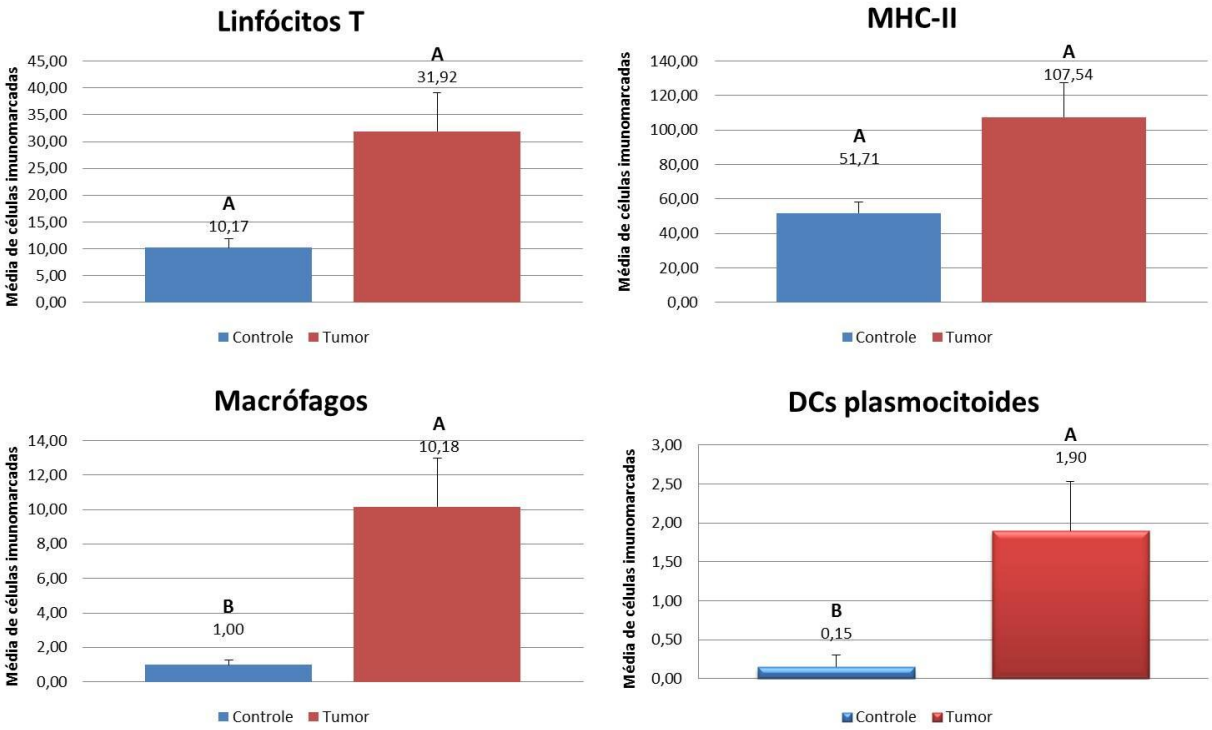


Figura 7. Médias e erros-padrões para a contagem das marcações dos linfócitos T, (Teste Mann-Whitney, p<0,0790), do MHC-II, (Teste Student Newman Keuls, p<0,0593) do macrófago (Teste Mann-Whitney, p<0,0472), e das DCs plasmocitoides (Teste Student Newman Keuls, p<0,0214) nos grupos controle e tumor nas mamas de cadelas.

A frequência de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em animais acometidos ou não por tumor de mama está representada em uma tabela de contingência (Tabela 4). O teste exato de Fisher (p<0,0019) mostrou que há dependência entre a presença de DCs plasmocitoides positivas e a presença de tumor mamário.

A análise da frequência da presença de imunomarcação das DCs plasmocitoides com o tipo histológico (Tabela 5) mostrou, pelo teste exato de Fisher (p<0,0080), que há dependência entre a presença de DCs plasmocitoides e o tipo histológico tumoral.

Tabela 4. Presença de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em glândula mamária de cães acometidos ou não por tumor mamário.

Presença de CD123		C	T	Total
Frequência	Ausência	8	7	15
Esperado		3,8	11,1	
Frequência	Presença	1	19	20
Esperado		5,1	14,8	
	Total	9	26	35

Legenda: na linha: C- grupo controle, T- grupo tumor. Teste exato de Fisher (p<0,0019).

Tabela 5. Presença de imunomarcação para DCs plasmocitoides (CD123) em relação ao tipo histológico dos tumores de mama caninos.

		Tipo Histológico				
Presença de CD123		C	P	T	S	Total
Frequência	Ausência	8	1	5	1	15
Esperado		3,8	2.5	7.28	1,2	
Frequência	Presença	1	5	12	2	20
Esperado		5.1	3.4	9.71	1,7	
	Total	9	6	17	3	35

Legenda: Na linha: C- Controle, P- Papilar, T- Tubular, S- sólido. Teste exato de Fisher (p<0,0080).

Pela determinação do coeficiente de correlação de Spearman (Figura 8) houve correlação positiva fraca (0,34) entre a quantidade de DCs plasmocitoides (CD123) e o tipo histológico do tumor. Houve ainda uma correlação positiva média (0,57) entre DCs plasmocitoides (CD123) e o grau do tumor.

DCp	1,00		
Tipo Hist.	0,34	1,00	
Grau	0,57	0,77	1,00
	DCp	Tipo Hist.	Grau

Figura 8. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para a avaliar a correlação entre a quantidade de DCs plasmocitoides, tipo histológico e grau dos tumores de mama caninos dos grupos controle e tumor.

Legenda: A tabela apresenta os resultados com significância estatística (vermelho) para a análise de correlação de Spearman . As correlações são definidas, de acordo com seu índice como: 0,2 - 0,4 – correlação fraca; 0,4 - 0,7 – correlação moderada; 0,7 - 0,9 – correlação forte. Índices positivos apresentam correlações diretamente proporcionais, índices negativos apresentam correlações inversamente proporcionais.
DCp (células dendríticas plasmocitoides), Tipo Hist. (tipo histológico), Grau (grau dos tumores de mama).

As médias de células imunomarcadas em todas as análises imuno-histoquímicas nos grupos controle e tumor estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Médias, desvio padrão e erro padrão das contagens das células imunomarcadas dos respectivos anticorpos nos grupos controle e tumor.

	Controles			Tumores		
Anticorpos	**Média**	**Desvio Padrão**	**Erro Padrão**	**Média**	**Desvio Padrão**	**Erro Padrão**
DCi	6,93B	6,31	2,10	53,10A	43,95	8,61
MHC-II	51,71A	19,22	6,40	107,54A	100,90	19,78
Linf T	10,17A	4,87	1,62	31,92A	36,49	7,15
DCm	0,53B	0,85	0,28	3,36B	2,76	0,54
Mac	1,00B	0,82	0,27	10,18A	14,46	2,83
MCs	3,31A	2,19	0,73	8,68A	8,00	1,57
DCp	0,15B	0,46	0,15	1,90A	3,22	0,63

Legenda: DCi (células dendríticas imaturas, Linf T (linfócitos T), DCm (células dendríticas maduras), Mac (macrófagos), MCs (mastócitos), DCp (células dendríticas plasmocitoides).
Letras iguais na coluna não diferem entre si pela análise de variância.

O resultado das análises de correlação de Spearman está demonstrado na Figura 9, para mostrar o grau de associação entre DC imatura, DC madura, DCs plasmocitoides, MHC-II, linfócito T, macrófago e mastócitos em tumores de mama caninos.

DCi						
MHC-II	0,37					
Linf T	0,37	0,41				
DCm	0,35	0,13	0,19			
MAC	0,30	0,01	0,35	0,38		
MCs	0,30	0,17	0,44	0,13	0,24	
DCp	0,49	0,17	0,03	0,33	0,15	0,17
	DCi	MHC-II	Linf T	DCm	MAC	MCs

FIGURA 9. Determinação do coeficiente de correlação de Spearman para o perfil celular (macrófagos, linfócitos, mastócitos e DCs imaturas e maduras), bem como para MHC-II e IL-3Rα, em tecidos mamários caninos dos grupos controle e tumor.

Legenda: A tabela apresenta os resultados com significância estatística (vermelho) para a análise de correlação de Spearman . As correlações são definidas, de acordo com seu índice como: 0,2 - 0,4 – correlação fraca; 0,4 - 0,7 –correlação moderada; 0,7 - 0,9 – correlação forte. Índices positivos apresentam correlações diretamente proporcionais, índices negativos apresentam correlações inversamente proporcionais.
DCi (células dendríticas imaturas, Linf T (linfócitos T), DCm (células dendríticas maduras), Mac (macrófagos), MCs (mastócitos), DCp (células dendríticas plasmocitoides).

Quanto aos linfonodos, avaliou-se apenas a marcação das DCs mieloides imaturas (anti-CD11c) e das DCs mieloides maduras (anti-CD83) nos linfonodos dos grupos controle e tumor. Nos linfonodos, a marcação das DCs mieloides imaturas foi concentrada em pequenos aglomerados celulares, localizadas nos folículos linfoides e na porção paracortical (Figura 10A), onde a média de células marcadas no grupo controle foi 35,34 ± 7,57 e para o grupo tumor foi de 77,32 ± 16,84. Não foi verificada diferença significativa entre os grupos (p=0,1567, teste Mann-Whitney / Figura 10B). A marcação das DCs mieloides maduras (anti-CD83) nos linfonodos ficou evidente no centro dos folículos linfoides (Figura 10C), onde a média de células marcadas no grupo controle foi de 0,6 ± 0,24 e de 1,62 ± 0,40 para o grupo tumor. Foi verificada diferença significativa entre os dois grupos (p=0,0173, teste SNK / Figura 10D).

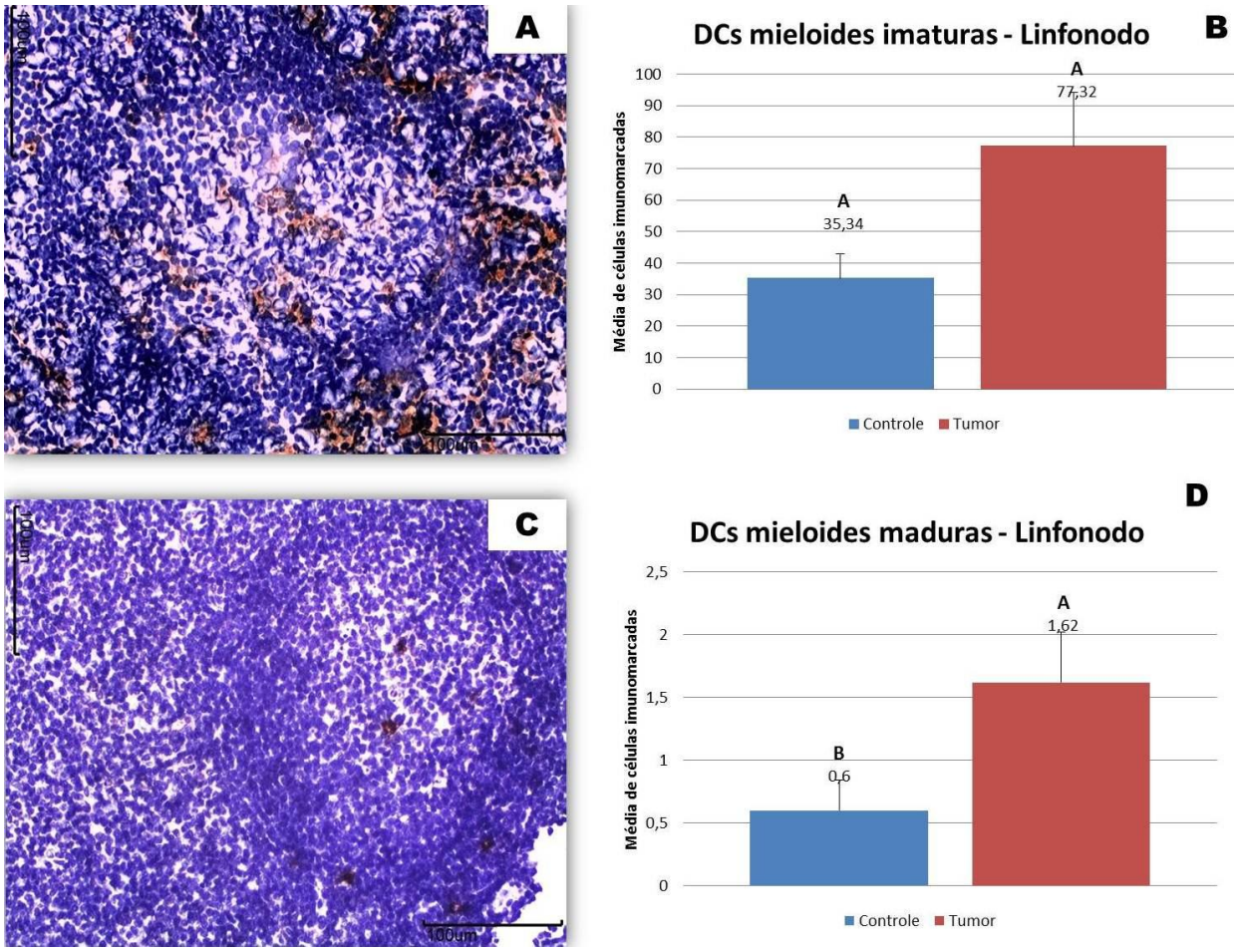


Figura 10. Fotomicrografias das imunomarcações em linfonodos inguinais de cadelas com tumor de mama e seus respectivos gráficos. (A) Marcação das DCs mieloides imaturas (anti-CD11c) concentrada no centro dos folículos linfoides e paracortical (barra = 100 µm). (B) Médias e erros-padrões das marcações das DCs mieloides imaturas (anti-CD11c, teste Mann-Whitney, p=0,1567) nos linfonodos dos grupos controle e tumor. (C) Marcação das DCs mieloide maduras (anti-CD83) localizada no centro dos folículos linfoides (barra = 100 µm). (D) Médias e erros-padrões das DCs mieloide maduras (anti-CD83, teste Student Newman Keuls, p=0,0173) nos linfonodos dos grupos controle e tumor.

VI. DISCUSSÃO

A neoplasia de mama é uma doença muito frequente em cadelas de meia idade a idosas, sendo considerada uma condição rara em fêmeas com menos de cinco anos de idade (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2007). No presente estudo, a idade média das cadelas com tumor de mama foi de 9,3 anos, dado este que está de acordo com os achados de Oliveira Filho et al. (2010), Daleck et al. (1998) e Lana, Rutteman, Withrow (2007). Deste mesmo grupo, a raça predominante foi a SRD, totalizando 43% do total de cadelas. As demais raças observadas foram rotweiller (13%), dachshund (13%), boxer (9%), labrador (9%) e poodle (9%). A discussão da prevalência das raças mais acometidas neste estudo fica limitada, pois não se conhece a população canina total da cidade de Jaboticabal (SP) e principalmente, das cidades ao seu redor, pois grande parte do número das cadelas que participaram deste estudo vieram de cidades vizinhas.

O volume médio dos tumores mamários foi de três centímetros, o que fica dentro da média de acordo com os achados de Queiroga e Lopes (2005) que descreveram que a maioria dos tumores malignos tem tamanho médio, entre três e cinco centímetros. No entanto, o tamanho do nódulo na mama pode ser influenciado pela fase do ciclo estral em que a cadela se encontra (FONSECA; DALECK, 2000). Neste estudo, essa informação não pode ser avaliada, visto que grande parte dos proprietários desconheciam o estágio do ciclo estral de suas cadelas.

Nenhum linfonodo analisado apresentou focos de micrometástases. Talvez isso se explique pelo fato de que os tumores avaliados neste trabalho não ultrapassaram três centímetros de comprimento, e segundo Chang et al. (2005), cães com metástases para linfonodos geralmente apresentam tumores maiores que cinco centímetros.

Durante a avaliação em microscopia de luz foi possível observar que os tumores de mama deste estudo apresentaram focos de infiltrado inflamatório. Estes eram compostos predominantemente por linfócitos, macrófagos e mastócitos. De acordo com Whiteside (2008), durante muito tempo acreditou-se que a presença do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral seria a prova da atividade imune

contra o crescimento neoplásico. Todavia, esse conceito mudou e atualmente preconiza-se que a reação inflamatória quando associada ao tumor, pode auxiliar no progresso das células neoplásicas ao invés de promover uma resposta imune efetiva (ASPORD et al., 2007). O que foi encontrado no presente estudo está bem próximo ao que o último autor descreveu, pois a presença de inflamação foi observada inclusive nos tipos histológicos mais agressivos.

Para a detecção das DCs é necessário o uso de técnicas especiais de identificação, como a imuno-histoquímica, pois se tornam indistinguíveis quando coradas apenas em HE (LINS, et al., 2006; NISHIKAWA et al, 2009), assim como foi proposto e realizado no presente estudo, já que as DCs foram facilmente confundidas com os macrófagos. Outras técnicas podem ser aplicadas para a sua identificação, como a imunofluorescência (BELL et al. 1999; ASPORD et al., 2007), citometria de fluxo (GERVAIS et al., 2005) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (BELL et al. 1999).

No presente estudo, foi possível observar que as imunomarcações de DCs mieloides imaturas e maduras foram significativamente maiores no grupo tumor do que no grupo controle, sendo a média do número de DCs imaturas maior do que a de maduras. Esta diferença reflete uma possível atividade do tumor sobre as DCs. Na literatura destaca-se que frente a um microambiente tumoral, as DCs podem apresentar falhas funcionais, como a baixa capacidade de estimulação dos linfócitos T (BELL et al., 1999). A maturação das DCs é crucial na iniciação da resposta imune e uma maturação ineficiente pode levar a diminuição de DCs maduras e funcionalmente competentes e ao aumento de DCs imaturas. A predominância destas últimas pode induzir a tolerância dos linfócitos T e ao escape tumoral da vigilância das DCs (GABRILOVICH, 2004; KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

Neste estudo, as DCs imaturas foram encontradas, em sua maioria no estroma tumoral e raramente no peri-tumoral e o inverso ocorreu com as DCs maduras. Nossos achados foram semelhantes aos encontrados por Bell et al. (1999), que relataram que em adenocarcinomas de mama em mulheres foi detectado que DCs imaturas ficam compartimentalizadas no meio das células tumorais, enquanto que DCs maduras ficam restritas à região peri-tumoral, todavia diferiu dos achados de Sandel et al. (2005) que observou o inverso em tumores colo-

retais, em humanos. De acordo com Bell et al (1999), esta separação de populações de DCs mieloides poderia indicar que os fatores estromais podem determinar a adesão das DCs, visto que fisiologicamente, as DCs maduras só são observadas em órgãos linfoides, onde elas interagem intimamente com os linfócitos T. No presente estudo as DCs maduras também foram observadas nos linfonodos drenantes, além do peri-tumoral. Da mesma forma, Bell et al. (1999) sugeriram que a presença das DCs maduras dentro do tumor refletiria uma resposta imune em curso, possivelmente tumor-específica. No presente estudo verificou-se predominância de DCs imaturas, o que parece diferir da sugestão destes autores, ou seja, não estaria ocorrendo uma atividade antitumoral. A presença de DCs maduras fora dos órgãos linfoides não é típica e está relacionada com quadro de inflamação, como por exemplo, na sinóvia de pacientes com artrite reumatoide ou no sangue de indivíduos com doença auto-imune sistêmica (THOMAS et al., 1999) e as consequências imunológicas das DCs maduras nos tumores permanecem desconhecidas (ASPORD et al., 2007).

O anticorpo anti-CD83 foi escolhido para a marcação de DCs maduras neste estudo, porque na medicina veterinária existem poucos relatos que mostrem a aplicação deste marcador para DCs maduras (QESKA, BAUMGÄRTNER, BEINEKE, 2013) diferente ao que acontece com humanos (AERTS-TOEGAERT et al., 2007; LECHMANN et al., 2008). Poindexter et al. (2004) relatam em suas pesquisas em humanos, que o CD83 é um marcador que tem se mostrado eficiente em identificar DCs maduras. De acordo com Cao, Lee e Lu (2005), durante a maturação das DCs em humanos, a cinética da indução de superfície do CD83 é mais rápida do que a do CD40, CD80 e CD86 quando exposto a LPS (lipopolissacarídeo), tornando-se um eficiente marcador de DCs maduras. No presente estudo, sugere-se que o CD83 foi um marcador de DCs maduras em tecidos de cadelas.

Em relação aos linfócitos T não foi verificada, no presente estudo, diferença estatística entre os grupos controle e tumor. Talvez este resultado possa ser reflexo de uma menor expressão dos linfócitos T no tecido com tumor de mama, ocasionada pela grande população de DCs imaturas. A sua incapacidade em amadurecer corretamente no momento da apresentação antigênica pode ter ocasionado a

intolerância dos linfócitos T, que não reconheceram o antígeno e, portanto não seguiram para o sítio tumoral.

Embora tenha sido observado, no presente estudo, um acúmulo de linfócitos T efetores no estroma tumoral, esse fato não pode ser considerado como evidência de vigilância imunitária por parte do hospedeiro, pois estas células parecem ser ineficazes em deter o crescimento tumoral, assim como descrito na literatura (WARABI, KITAGAWA, HIROKAWA 2000; WHITESIDE, 2008). Isso reflete a incapacidade das DCs em estimular os linfócitos T corretamente (GABRILOVICH, 2004). Castanheira (2013) verificou maior expressão de TNF-α, IL-4 e IL-10 e predominância de macrófagos e linfócitos T nos carcinomas mamários de cadelas. Estes resultados estavam relacionados à malignidade e à progressão destes tumores nas cadelas. Não se deve descartar o papel dos linfócitos T regulatórios (Treg) no favorecimento do desenvolvimento tumoral. Em estudos futuros seria interessante avaliar a presença destas células nos carcinomas mamários de cadelas e verificar se elas poderiam influenciar na diferenciação e maturação das DCs no microambiente tumoral, bem como no perfil de citocinas local. De acordo com o estudo realizado por Aspord et al. (2007), tumores de mama humanos induzidos em ratos apresentaram infiltração de linfócitos T CD4+ que expressavam IL-13. As citocinas expressadas pelos linfócitos T, tanto Th1 (IFN-γ) quanto Th2 (IL-4 e IL-13) foram mesuradas e foi observado que o câncer de mama em mulheres polariza linfócitos T $CD4^+$ *in vivo* por intermédio das DCs. Estes linfócitos T $CD4^+$, portanto, influenciados por DCs, originaram uma resposta Th2 e segregaram IL-13, ilustrando mais uma forma do tumor manipular as DCs e as outras células inflamatórias.

O MHC desempenha um papel importante em vários tipos de reações imunes e uma delas é a participação na apresentação de antígenos. O MHC de classe I é expresso em todos os tipos de células, enquanto que o MHC de classe II está limitado a tipos celulares específicos como os macrófagos, linfócitos B e DCs que apresentam antígenos, entre eles, os antígenos tumorais (WARABI; KITAGAWA; HIROKAWA, 2000). No presente estudo não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo controle e tumor quanto à expressão da molécula de MHC-II.

Neste estudo, a ineficiente expressão de moléculas do MHC-II, caracterizada por sua imunodetecção no citoplasma das células inflamatórias e neoplásicas, poderia explicar a incapacidade de apresentação antigênica para linfócitos T. Da mesma forma, a menor quantidade de DCs maduras em relação às DCs imaturas também pode estar relacionada, uma vez que apenas as DCs maduras podem expressar moléculas de MHC em sua membrana citoplasmática. Na literatura destaca-se que o aumento de IL-10 (resposta TH2) pode ocasionar a diminuição da expressão de MHC II nas fases iniciais da resposta imune, contribuindo para a inibição da ativação de células T (ABBAS; LICHTMAN, 2007b).

Os macrófagos são células comumente observadas no interior de tumores (KLIMP et al., 2002) e quando estão neste ambiente são denominados de macrófagos associados ao tumor (TAMs). Há a hipótese de que os TAMs sejam recrutados para os sítios tumorais, através da expressão de potentes agentes quimioatrativos, e neste local suas atividades são aproveitadas pelo tumor para promover a progressão tumoral e a metástase (LIN; POLLARD, 2004), onde são reprogramados para inibir a função de linfócitos, por meio de citocinas inibidoras, tais como a IL-10 (WHITESIDE, 2008). Neste trabalho, os macrófagos foram encontrados em moderada quantidade, principalmente no padrão histológico tubular. Foi observada diferença estatística significativa entre os grupos controle e tumor, onde a presença de macrófagos foi maior no grupo tumor. Talvez os resultados obtidos possam ser reflexo dessa quimioatração dos macrófagos para o foco tumoral. Castanheira (2013) verificou predominância de macrófagos em carcinomas mamários caninos e de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10). Outros estudos seriam necessários para se determinar qual é a subpopulação de macrófagos está presente no microambiente tumoral. Na literatura científica os macrófagos regulatórios (M2) estão em evidência, como células que podem contribuir para a manutenção de um ambiente tumoral imunossupressor (TANG, 2013).

Um dos possíveis coadjuvantes do desenvolvimento tumoral são os mastócitos, que podem se acumular ao redor dos sítios de crescimento neoplásico, em resposta a vários quimioatrativos derivados dos tumores (THEOHARIDES et al., 2004). Desta forma, os tumores podem controlar a atividade mastocitária, o que inclui a atração de DCs imaturas para o foco neoplásico (BACCI; PIMPINELLI;

ROMAGNOLE, 2010). Enquanto na literatura médica se acumulam fortes evidências sobre o papel dos MCs na oncogênese humana, até o momento existem poucos relatos veterinários focalizando o assunto (SFACTERIA et al., 2011). A ação de uma neoplasia sobre as DCs causa retardo na maturação destas células e as impede de amadurecer e apresentar o antígeno tumoral aos linfócitos T. Esse evento ocasiona a diminuição do número de linfócitos T presentes no sítio tumoral. A depleção de linfócitos T no tumor pode influenciar no controle da degranulação mastocitária, visto que eles auxiliam na regulação desta atividade dos mastócitos (GRI, et al., 2008; MEKORI; HERSHKO, 2012). O acúmulo de mastócitos ao redor do sítio neoplásico e a maior quantidade de histamina podem beneficiar o desenvolvimento da neoplasia (DABIRI et al., 2004). Em humanos já foi relatado que quando os MCs são sensibilizados pelas células tumorais, liberam mediadores que podem alterar a maturação das DCs, mantendo-as imaturas e ocasionando uma reação de tolerância imunológica aos linfócitos T (DUDECK, et al., 2011). No presente estudo, houve correlação moderada entre a presença de linfócitos T e a de mastócitos nas mamas com tumor, além de correlação fraca entre os mastócitos e as DCs imaturas e nenhuma correlação foi detectada entre os mastócitos e as DCs maduras.

As características do tumor podem afetar a resposta imune no seu linfonodo sentinela. Dentro dos 15 linfonodos avaliados, houve predominância de DCs imaturas nos linfonodos do grupo tumor, mas não diferença estatística entre os grupos. Diferentemente, Iwamoto et al. (2003) e Poindexter et al. (2004) identificaram um acúmulo significativo de DCs imaturas no linfonodo sentinela de mulheres com tumor de mama. Esse excesso de DCS imaturas poderia facilitar a formação de metástases para os linfonodos regionais. Já a marcação de DCs maduras no presente estudo foi maior nos linfonodos de mamas com tumor do que nos linfonodos das mamas controle, resultando em diferença estatística. Poindexter et al. (2004) ressalvam que em seus estudos, verificou-se uma tendência para um maior número de DCs maduras nos linfonodos sentinelas livres metástase do que em linfonodos sentinelas com metástase, fato este que não pode ser comparado neste estudo, uma vez que não foram observadas metástases nos linfonodos caninos.

Alguns autores afirmam que o infiltrado de DCs mieloides no interior das neoplasias pode influenciar no prognóstico dos tumores de mama da mulher (IWAMOTO et al., 2003). Na realidade, a infiltração de DCs mieloides no interior de carcinomas mamários em mulheres não é um fator prognóstico, pois de acordo com Treilleux et al. (2004), a infiltração de DCs plasmocitoides é que tem relação com baixa sobrevida. No presente estudo foi realizada esta mesma relação, onde se buscou comparar a presença das DCs plasmocitoides no interior dos tumores mamários em cadelas com o prognóstico e sobrevida das mesmas. Os nossos resultados mostraram uma correlação positiva média entre o grau histológico (grau 1, 2 e 3) tumoral e a quantidade de DCs plasmocitoides infiltrantes no tumor, o que indica que os tumores grau três foram os que tiveram maior infiltrado de DCs plasmocitoides, corroborando com os achados de Treilleux et al, 2004. Da mesma forma, no presente estudo, verificou-se dependência significativa entre a presença de DCs plasmocitoides e a presença do tumor de mama nas cadelas, pelo Teste Exato de Fisher.

Em suma, no estudo apresentado sugere-se que a ação dos linfócitos T possivelmente foi suprimida pela falha na apresentação antigênica por DCs com fenótipo imaturo. As DCs e o infiltrado inflamatório, dentro do microambiente tumoral, possivelmente deixaram de exercer funções efetoras antitumorais e com isso teriam favorecido o crescimento tumoral. Além disso, os mastócitos se acumularam ao redor do sítio tumoral também, possivelmente sob o controle das células tumorais, influenciando indiretamente na maturação das DCs mieloides. Sugere-se que em estudos futuros possa ser avaliada a expressão de citocinas. Da mesma forma avaliar o papel da histamina no microambiente tumoral seria interessante, pois na literatura este mediador inflamatório também foi relacionado com o crescimento tumoral. Associar estas observações com a atividade das DCs poderia contribuir para a compreensão da complexa patogenia das neoplasias de mamas em cadelas.

VII. CONCLUSÕES

Foi possível concluir que:

- Há relação entre a presença de DCs mieloides maduras e imaturas e o infiltrado inflamatório encontrado, principalmente entre as DCs e os linfócitos.

- Houve predominância de DCs imaturas nas mamas com tumor.

- As DCs imaturas predominaram e tiveram uma co-localização intimamente associada ao tumor.

- Os linfócitos, macrófagos e mastócitos foram predominantes no grupo tumor e podem ter influencia no desenvolvimento tumoral.

- Não houve associação entre a presença de mastócitos e DCs mieloides nos tumores de mama das cadelas, talvez porque os MCs sejam importantes nos estágios inicias do desenvolvimento tumoral.

- As presença das DCs plasmocitoides no sítio tumoral é um indicativo de mau prognóstico do tumor de mama em cadelas, assim como em mulheres.

VIII. REFERÊNCIAS[1]

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Captura e apresentação dos antígenos aos linfócitos. In:_____. **Imunologia básica** – funções e distúrbios do sistema imunológico. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2007a. cap. 3, p. 45-68.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Reconhecimento antigênico no sistema imune adaptativo. In:_____. **Imunologia básica** – funções e distúrbios do sistema imunológico. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2007b. cap. 4, p. 69-90

AERTS-TOEGAERT, C.; HEIRMAN, C.; TUYAERTS, S.; CORTHALS, J.; AERTS, J. L.; BONEHILL, A.; THIELEMANS, K.; BRECKPOT, K. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.37, n.3, p.686–695, 2007. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/eji.200636535 >.

ARDAVÍN, C.; DEL HOYO, G. M.; MARTÍN, P.; ANJUÈRE, F.; ARIAS, C. F.; MARÍN, A. R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNÁNDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 691-700, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02059-2>

ASPORD, C.; PEDROZA-GONZALEZ, A.; GALLEGOS, M.; TINDLE, S.; BURTON, E. C.; SU, D.; MARCHES, F.; BANCHEREAU,J.; PALUCKA, A. K. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13–secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 204, n. 5, p. 1037–1047, 2007.

BACCI, S.; PIMPINELLI, N.; ROMAGNOLI, P. Contacts between mast cells and dendritic cells in the human skin. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, Firenze, v. 115, n. 1-2, p. 25-30, 2010.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, Londres, v. 392, p. 245-252, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/32588>.

[1] A apresentação das referências obedece as normas da ABNT – NBR 6023/2002

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto v. 18, p. 767–811, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>

BARTLETT, M.S. The Use of Transformations. Biometrics, v. 3, n. 1, 1947, pp. 39-52.

BELL, D.; CHOMARAT, P.; BROYLES, D.; NETTO, G.; HARB, G. M.; LEBECQUE, S.; VALLADEAU, J.; DAVOUST, J.; PALUCKA, K. A..; BANCHEREAU, J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 190, n. 10, p. 1417–1425, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/0022-1007/99/11/1417/09>

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochemical Journal**, London, v. 385, n. 1, p. 85-93, 2005.

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

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; LIMA, A. E.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL , R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO K. A.;AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALMAN, C.; SUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M.; F.; FONTELES, Z. G. C.; ICHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; OCHA, N. S. R.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; ALMEIDA, E. C. P. de. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASTANHEIRA, T. L. L. **Expressão de citocinas em tecido mamário e sua relação com a malignidade de tumores de mama em cadelas**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, ”Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

CHANG S.; CHANG C.; CHANG T.; WONG M. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n. 10, p.1625-1629, 2005.

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

DABIRI, S.; HUNTSMAN, D.; MAKRETSOV, N.; CHEANG, M.; GILKS, B.; BADJIK, C.; GELMON, K.; CHIA, S.; HAYES, M. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 17, p. 690–695, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800094>.

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

DELLA BELLA, S.; GENNARO, M.; VACCARI, M.; FERRARIS, C.; NICOLA, S.; RIVA, A.; CLERICI, M.; GRECO, M.; VILLA, M. L. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 89, n. 8, p. 1463-1472, 2003.

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

DUDECK, A.; SUENDER, C. A.; KOSTKA, S. L.; VON STEBUT, E.; MAURER, M. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 41, p. 1883–1893, 2011. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040994>.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology,** Oxford, v. 19, p. 403-410, 1991.

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

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

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumourinduced dendritic-cell defects. **Nature Reviews**, Londres, v. 4, p. 941-952, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1498>.

GERVAIS, A.; LEVÊQUE, J.; BOUET-TOUSSAINT, F.; BURTIN, F.; LESIMPLE, T.; SULPICE, L.; PATARD, J. J.; GENETET, N.; CATROS-QUEMENER, V. Dendritic cells are defective in breast cancer patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency. **Breast Cancer Research**, London, v. 7, n.3, p. 326-335, 2005. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1186/bcr1001 >

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

GRI, G.; PICONESE, S.; FROSSI, B.; MANFROI, V.; MERLUZZI, S.; TRIPODO, C.; VIOLA, A.; ODOM, S.; RIVERA, J.; COLOMBO, M. P.; PUCILLO, C. E. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. **Immunity**, Cambridge, v. 29, n. 5, p. 771-781, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.018>.

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

HEIDARPOUR, M.; RAJABI, M. A.; RAJABI, P.; FARKHANI, H. S. Mast cells in invasive ductal breast carcinoma. **Journal of Research in Medical Sciences**, Isfahan,v. 13, n. 5, p. 255-259, 2008.

IWAMOTO, M.; SHINOHARA, H.; MIYAMOTO, A.; OKUZAWA, M.; MABUCHI, H.; NOHARA, T.; GON, G.; TOYODA, M.; TANIGAWA, N. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. **International Journal of Cancer**, Nova York, v. 104, n. 1, p. 92-7, 2003. Disponível em: <http://doi.dx.org/10.1002/ijc.10915>.

JIANG, Y. A.; ZHANG, Y. Y.; LUO, H. S.; XING, S. F. Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 8, n. 6, p. 1005-1008, 2002.

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

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

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

KALINSKI, P.; MAILLIARD, R. B.; GIERMASZ, A.; ZEH, H. J.; BASSE, P.; BARTLETT, D. L.; KIRKWOOD, J. M.; LOTZE, M. T.; HERBERMAN, R. B. Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy, Londres, v. 5, n. 10, p. 1303-1315, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.5.10.1303>.

KARPUS, W. J. T Cell Receptor and CD3 Antibody Crossreactivity Opens New Research and Veterinary Medicine Opportunities. **Cytometry Part A**, Hoboken, v. 71A, n. 12, p.976-977, 2007. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20500 >

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

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, Boca Raton, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

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

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; FERREIRA, M.A. N. D.; CASSALI, G. D. Mast cells and angiogenesis in canine mammary tumor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1348-1351, 2010.

LECHMANN, M.; SHUMAN, N.; WAKEHAM, A.; MAK, T. W. The CD83 reporter mouse elucidates the activity of the CD83 promoter in B, T, and dendritic cell populations in vivo. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America** (PNAS), Washington, v. 105, n. 33, p. 11887–11892, 2008. DIsponível em: < http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806335105 >.

LIN, E. Y.; POLLARD, J. W. Macrophages: modulators of breast cancer progression. In: NOVARTIS FOUNDATION SYMPOSIUM, 256., 2004, London. **Resumos**… London: NFS, 2004. p. 58-68.

LINS, R. D. A. U.; DE FIGUEIREDO, C. R. L. V.; GODOY, G. P.; DA SILVEIRA, E. J. D.; FREITAS, R. A. Análise qualitativa e quantitativa do padrão de expressão imuno-histoquímica das células dendríticas na doença periodontal. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 5, n. 1, p. 65-74, 2006.

LIU, K.; NUSSENZWEIG, M. C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 234, n. 1, p. 45–54, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x>.

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

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

MARTINS, L. R.; LOPES, M. D. Pseudociese canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 3/4, p. 137-141, 2005.

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

MAZZONI, A.; SIRAGANIAN, R. P.; LEIFER, C. A.; SEGAL, D. M. Dendritic cell modulation by mast cells controls the Th1/Th2 balance in responding T cells1. **The Journal of Immunology***,* Bethesda, v. 177, n. 6, p. 3577–3581, 2006.

MEKORI, Y. A.; HERSHKO, A. Y. T Cell-mediated modulation of mast cell function: heterotypic adhesion-induced stimulatory or inhibitory effects. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00006>.

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

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

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

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

NISHIKAWA, Y.; SATO, H.; OKA, T.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, K. Immunohistochemical Discrimination of Plasmacytoid Dendritic Cells from Myeloid Dendritic Cells in Human Pathological Tissues. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology**, Tokyo, v. 49, n. 1, p. 23-31, 2009.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, n. 2, p. 105-100, 2003.

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

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

PIÑA-OVIEDO, S.; ORTIZ-HIDALGO, C. Neoplasia hematodérmica CD4+/CD56+. Diagnóstico histopatológico, fisiopatología y avances recientes de untumor originado en células dendríticas plasmocitoides. **Revista Española de Patología**, Madrid, v. 40, n. 1, p.11-22, 2007.

POINDEXTER, N. J.; SAHIN, A.; CAÇA, K. K.; GRIMM, E. A. Analysis of dendritic cells in tumor-free and tumor-containing sentinel lymph nodes from patients with breast câncer. **Breast Cancer Research**, London, v. 6, n. 4, p. 408-415, 2004. Disponível em: <http://doi.dx.org/10.1186/bcr808>.

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

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

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

REZK, S. A.; NATHWANI, B. N.; ZHAO, X.; WEISS, L. M. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. **Human Pathology**, Philadelphia v. 44, n. 6, p. 937-950, 2013. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.005>.

RICKLIN GUTZWILLER, M. E.; MOULIN, H. R.; ZURBRIGGEN, A.; ROOSJE, P.; SUMMERFIELD, A. Comparative analysis of canine monocyteandbone-marrow-derived dendritic cells. **Veterinary Research**, Paris, v. 41, n. 4, p. 2-12, 2010. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2010012 >

ROVERE, F. D.; GRANATA, A.; FAMILIARI, D.; D'ARRIGO, G.; MONDELLO, B.; BASILE, G. Mast cells in invasive ductal breast cancer: different behavior in high and minimum hormone-receptive cancers. **Anticancer Research**, Atenas, v. 27, p. 2465-2472, 2007.

SANDEL, M. H.; DADABAYEV, A. R.; MENON, A. G.; MORREAU, H.; MELIEF, C. J. M.; OFFRINGA, R.; VAN DER BURG, S. H.; JANSSEN-VAN RHIJN,C. M.; ENSINK, N. G.; TOLLENAAR, R. A. E. M.; VAN DE VELDE, C. J. H.; KUPPEN, P. J. K. PrognosticValue ofTumor-Infiltrating Dendritic Cells in Colorectal Cancer: Role ofMaturation Status and Intratumoral Localization. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, n. 7, p. 2576-2582, 2005.

SFACTERIA, A.; LANTERI, G.; GRASSO, G.; MACRÌ, B.; MAZZULLO, G. Mast cells in canine mammary gland tumour: number, distribution and EPOR positivity. **Veterinary and Comparative Oncology**, Malden, v. 9, n. 4, p. 310–315, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00277.x>.

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

TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Letters**, Virginia, v.332, n.1 p. 3–10, 2013. Disponível em : < http://doi.dx.org/10.1016/j.canlet.2013.01.024 >

THEOHARIDES, T. C.; CONTI, P. Mast cells: the JEKYLL and HYDE of tumor growth. **Trends in Immunology**, Cambrigde (USA), v. 25, n. 5, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2004.02.013>.

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

THOMAS, R.; MACDONALD, K. P.; PETTIT, A. R.; CAVANAGH, L. L.; PADMANABHA, J.; ZEHNTNER, S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Journal of Leukocyte Biology,** Bethesda, v. 66, p. 286–292, 1999.

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

TREILLEUX, I.; BLAY, J. Y.; BENDRISS-VERMARE, N.; RAY-COQUARD, I.; BACHELOT, T.; GUASTALLA, J. P.; BREMOND, A.; GODDARD, S.; PIN, J. J.; BARTHELEMY-DUBOIS, C.; LEBECQUE, S. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 10, p. 7466-7474, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0684>.

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

WANG, Y. S.; CHI, K. H.; LIAO, K. W.; LIU, C. C.; CHENG, C. L.; LIN, Y. C.; CHENG, C. H.; CHU, R. M. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 165–174, 2007b.

WARABI, M.; KITAGAWA, M.; HIROKAWA, K. Loss of MHC class II expression is associated with a decrease of tumor-infiltrating T cells and an increase of metastatic potential of colorectal cancer: immunohistological and histopathological analyses as compared with normal colonic mucosa and adenomas. **Pathology Research and Practice**, Stuttgart, v. 196, n. 12, p. 807-815, 2000.

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

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene,** London, v. 27, p. 5904-5912, 2008.

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

ZENG, L.; TAKEYA, M.; LING, X.; NAGASAKI, A.; TAKAHASHI, K. Interspecies reactivities of anti-human macrophage monoclonal antibodies to various animal species. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 44, n. 8, p. 845-853, 1996.

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

ZUNIGA, E. I.; MCGAVERN, D. B.; PRUNEDA-PAZ, J. L.; TENG, C.; OLDSTONE, M. B. A. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. **Nature Immunology**, New York, v. 5, n. 12, p. 1227-1234, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ni1136>.

APÊNDICE

APÊNDICE 1. Questionário aplicado aos proprietários das cadelas com tumor de mama.

ESTUDO SOBRE NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Nome do Animal: **RG HV:**
Idade: **Raça:**
Proprietário:
Telefone: **Cidade:**

Castrada: ( ) Sim ( ) Não
Tempo de Evolução: **Ulcerado:** ( ) Sim ( ) Não
Metastáse: ( ) Sim ( ) Não **Local:**
Recidiva: ( ) Sim ( )Não **Uso prévio de contraceptivos:** ( ) Sim ( ) Não
Conformação (estado corporal):
( )Magro ( )Normal ( )Sobrepeso
Ciclo estral:
( )6/6 meses
( )Menor que 6 meses
( )Maior que 6 meses
( )Não e observado
Obs. .....
Duração do estro (dias): .....
Número de partos: .....
Número médio de filhotes por parto: .....
Tipo de parto:
( )Normal ( )Cesariana
Alterações patológicas com fetos (filhotes):
( )Não ( )Sim. Qual?.....
Apresentação de pseudociese:
( )Não ( )Sim. Freqüência: .....
Em caso de pseudociese:
( )Com produção láctea
( )Sem produção láctea
Mastite clinica:
( )Não diagnosticada
( )Uma vez
( )Duas vezes
( )Três ou mais vezes
( )Outros.....
Presença de secreção mamária: .....
Presença de outros tumores: .....Local:.....
Alteração comportamental após a observação do tumor:.....
Ocorrência de tumor mamário em ascendentes ou descendentes com tumor mamário:
( )Sim. Quem?.....
( )Não
( )Não sabe informar

Ocorrência de ascendentes ou descendentes com outros tipos de tumores:

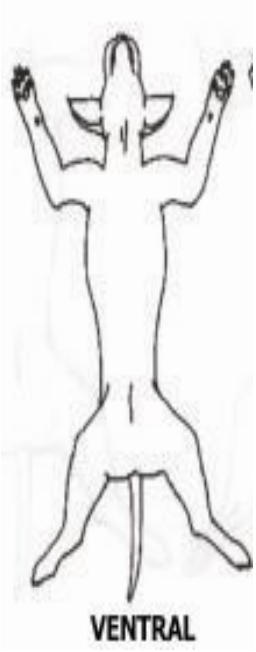
( )Sim. Quem e tipo:.....

( )Não

( )Não sabe informar

Obs. .....

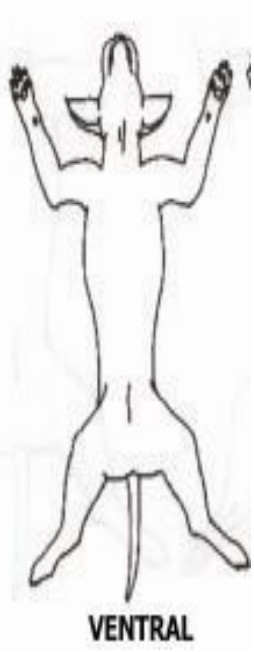
ESQUERDA



TAMANHO

Esquerda	Direita
M1:	M1:
M2:	M2:
M3:	M3:
M4:	M4:
M5:	M5:
Linfonodo:	Linfonodo:

DIREITA



DATA:

PÓS-GRADUANDO RESPONSÁVEL PELA COLETA:

Apêndice 2. Gradação histológica de malignidade das neoplasias mamárias de acordo com Elston & Ellis (1998).

Atributos	Escore
Formação Tubular	
> 75% do tumor	1
De 10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo Nuclear	
Tamanho do núcleo semelhante a uma célula normal (2 a 3 vezes o tamanho dos glóbulos vermelhos)	1
Aumento de tamanho moderado	2
Aumento de tamanho bem evidenciado	3
Número de Mitoses (10 campos de grande aumento*)	
De 0 a 8 mitoses	1
De 9 a 16 mitoses	2
17 mitoses ou mais	3

* objetiva de 40x.