

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Caracterização da resposta imune celular pela expressão
imunoistoquímica de CD4, CD8, CD28, CD152, CD56 e Foxp3
em carcinoma mamário de fêmeas caninas**

Caio de Faria Tiosso

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Caracterização da resposta imune celular pela expressão
imunoistoquímica de CD4, CD8, CD28, CD152, CD56 e Foxp3
em carcinoma mamário de fêmeas caninas**

Autor: Caio de Faria Tiosso

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAIO DE FARIA TIOSSO – Filho de Emerênciana Maria de Faria Tiosso e João Alberto Tiosso, nascido na cidade de Mogi das Cruzes – SP, no dia 20 de Agosto de 1984. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Metropolitana de Santos “UNIMES”, em março de 2003, concluindo-o em dezembro de 2007. Em março de 2010 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) campus de Jaboticabal, obtendo bolsa da Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo nº 2009/12698-7) na categoria mestrado.

CAMINHADA

Tua caminhada ainda não terminou
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar à perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

**Dedico este trabalho a meu Pai,
minha Mãe e minha Irmã por estarem sempre ao meu lado me dando todo amor e
carinho. Dedico também aos meus amigos pela parceria, ajuda e paciência. Não
poderia esquecer minha noiva por estar sempre ao meu lado me aconselhando e
dando-me carinho.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me presentear com a linda família que tenho, grandes amigos que fiz, e bela noiva que encontrei.

Ao Professor Doutor Wilter Ricardo Russiano Vicente por ter me aceito nessa empreitada e confiado na minha capacidade para tocar adiante esse projeto.

A Professora Doutora Reneé Laufer Amorim, por ter me recebido em seu laboratório na UNESP-Botucatu, pela amizade, paciência, e ajuda que me deu.

A Professora Doutora Mirela Tinucci, pelos ensinamentos fundamentais nesse projeto.

A Professora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pela ajuda indispensável e ensinamentos.

A todos os professores do departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária.

A minha família por sempre estar ao meu lado, me dando apoio, segurança, carinho, tranquilidade e o mais importante, amor.

Aos meus avós pelo exemplo de vida, carinho e amor que sempre me deram.

Aos meus tios Ana Maria Tiosso e Marcos Basseto, por terem me acolhido em sua casa.

A minha noiva Fabiana Azevedo Voorwald pelo carinho, compreensão e paciência.

Aos meus amigos Ricardo, Juliana, Felipe, Luciana, Giuliano, Aracelle, Maricy, Beatrice, Raquel, Marina, Leandro, Marquinhos, Pedro Paulo, Diogo, Carol, Paulinha e todos que me ajudaram de alguma forma para o desenvolvimento desse projeto.

Aos colegas Carlos Eduardo e Raquel pela colaboração na realização dos exames de imunoistoquímica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/Fapesp, pela concessão de bolsa e auxílio a pesquisa.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel pelo auxílio.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, em especial ao programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária pelo acolhimento.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

SUMARIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Anatomia, morfologia e patofisiologia da glândula mamária.....	1
1.2 Neoplasias mamárias	3
1.3 Incidência e predisposição racial.....	3
1.4 Classificação das neoplasias mamárias	4
1.5 Etiologia.....	4
1.6 Métodos diagnóstico e prognóstico.....	7
1.7 Sistema imune	8
1.8 Células T CD4 e CD8.....	9
1.9 Células dendríticas	12
1.10 Receptores co-estimulatórios e inibidores da família CD28	12
1.11 Células T regulatórias	14
1.12 Células NK.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Coleta de material	19
3.2 Processamento das amostras	19
3.3 Imunoistoquímica dos cortes em parafina.....	20

3.4 Imunoistoquímica dos cortes congelados.....	21
3.5 Análises quantitativas	22
3.6 Análises estatísticas.....	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Grau de infiltrado inflamatório	24
4.2 Padrão de imunorreatividade para CD4.....	24
4.3 Padrão de imunorreatividade para CD8.....	25
4.4 Padrão de imunorreatividade para o CD28.....	26
4.5 Padrão de imunorreatividade para o CD152.....	26
4.6 Padrão de imunorreatividade para o CD56.....	28
4.7 Padrão de imunorreatividade para o Foxp3	28
5. DISCUSSÃO	32
5.1 CD4 e CD8.....	34
5.2 CD28	35
5.3 CD152	36
5.4 Foxp3.....	37
5.5 CD56	39
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

Caracterização da resposta imune celular pela expressão de CD4, CD8, CD4⁺CD25⁺, CD28, CD152 e NK, por meio de imunoistoquímica, em carcinoma mamário de fêmeas caninas

RESUMO - O estudo dos tumores mamários em cadelas revela-se como um excelente modelo para a investigação das neoplasias mamárias em mulheres e tanto no homem quanto nos animais a resposta imune pode interferir no desenvolvimento de neoplasias. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia e estimulação do sistema imune celular em tumores mamários de fêmeas caninas por meio da expressão de CD4, CD8, CD4⁺CD25⁺ (Foxp3), CD28, CD152 e CD56 (NK). A avaliação da expressão desses marcadores foi avaliada por imunoistoquímica, utilizando-se o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. Para a realização desse estudo foram coletadas 20 amostras de tumores mamários de fêmeas caninas e essas divididas de acordo com a classificação histopatológica em 2 grupos: 10 carcinomas simples e 10 carcinomas complexos. Em relação aos resultados não se observou diferenças quanto à quantificação das células imunomarcadas quando comparadas segundo o tipo tumoral. No caso dos carcinomas simples evidenciou-se diferença entre a quantificação das células imunomarcadas ($P < 0,05$) pelo anticorpo CD28 ($p=0,03$) e Foxp3 ($p=0,01$) sendo menores que todas as demais marcações. Já para os carcinomas complexos houve diferença entre a quantificação das células imunomarcadas ($P= 0,05$) pelo anticorpo CD-152 que apresentou valor maior que as demais marcações com exceção do CD8. Os marcadores CD28, CD56 e Foxp3 foram menores que o CD8 ($p=0,01$) sendo o Foxp3 menor que todos os outros marcadores. No presente estudo observou-se que existe um controle negativo do sistema imune em ambos os casos, porém esse controle negativo foi mais evidente no carcinoma complexo, demonstrando assim que a falha do sistema imune em reconhecer as células tumorais como antígenos em tumores com maior grau de malignidade é.

Palavras-chave: neoplasia mamária, imunoistoquímica, carcinoma, sistema imune, linfócitos T, NK

Characterization of the cellular immune response by expression of CD4, CD8, CD4 + CD25 +, CD28, CD152 and NK cells, by immunohistochemistry in breast carcinoma in female dogs

ABSTRACT - The mammary tumor study in female dogs is revealed as an excellent model for the investigation of breast tumors in humans. On both species, the immune system can interfere on neoplasia progression. The aim of this study was to evaluate the immunolocalization and quantification of CD4, CD8, CD4⁺CD25⁺ (Foxp3), CD28, CD152 and NK in tumour lymphocyte infiltration, to evaluate the efficacy of stimulation and immune system defense in canine mammary carcinoma. The expression of these markers using immunohistochemistry was made by streptavidin-biotin peroxidase method. The tissues were collected from twenty mammary carcinomas, subdivided in ten simple carcinomas and ten complex carcinomas of twenty female dogs. This study identified no significant differences on quantification of positive cellular staining in simple carcinoma compared with complex carcinoma. The samples of simple carcinoma resulted significant differences on positive staining between the antibodies CD28 ($p=0,03$) and Foxp3 ($p=0,01$) and these markers revealed less quantitative staining compared with the others markers (CD4, CD8, CD152 and NK). The samples of complex carcinoma resulted significant differences on cellular staining quantification by the antibody CD152 ($p<0,05$) compared with the others markers (CD4, Foxp3, CD28, and NK) with exception when compared with CD8. The immune quantification of positive cellular staining about the markers CD28, CD56 and Foxp3 were smaller than CD8 ($p=0,01$), and the Foxp3 was smallest than those others markers. It was concluded that exist a negative control of immune system to complex and simple mammary carcinoma, but, this negative control was more significant in female dogs with complex mammary carcinoma.

Key-words: mammary neoplasia, immunohistochemistry, carcinoma, immune system, T lymphocytes, NK.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Anticorpos Dependentes de Citotoxicidade Celular
AG	Antígeno
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
CD	Cluster of Differentiation
CD152	Cluster of Differentiation 152
CD25	Cluster of Differentiation 25
CD28	Cluster of Differentiation 28
CD4	Cluster of Differentiation 4 (Linfócito T Helper)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (Linfócito T Citotóxico)
CD80	Cluster of Differentiation 80
CD86	Cluster of Differentiation 86
CTLA-4	Citolytic T Lymphocyte Associated Antigen 4
DAB	Diaminobenzidina
DCs	Células Dendríticas
DNA	Acido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ER	Receptor de Estrógeno
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FCRI	Receptor FC
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Foxp3	Forkhead Box Protein 3

GH	Hormônio do Crescimento (Growth Hormone)
IGFI	Insuline Growth Factor (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina)
IgG	Imunoglobulina G
IL -18	Interleucina 18
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
INF	Intérferon
INF-g	Intérferon g
INF-y	Intérferon y
L-12	Interleucina 12
MHC I	Complexo de Histocompatibilidade Maior I
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Maior II
NK	Natural Killer
OH	Ovário Histerectomia
PR	Receptor de Progesterona
PRL-R	Receptor de Prolactina
RTNF	Receptor de Necrose Tumoral
TCR	Receptor de Células T
TGF- α	Fator de Crescimento Tumoral Alfa
TGF-b	Growth Factor Tumor beta (Fator de Crescimento Tumoral)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TREGS	Células T Regulatórias
TRIS	Trizma Base
TVT	Tumor Venéreo Transmissível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica, tanto em tecido congelado quanto em tecido fixado em parafina, com o protocolo imunoistoquímico de acordo com cada anticorpo. 22

Tabela 2. Resumo das células imunomarcadas por tumores em porcentagem.....29

Tabela 3. Resumo da quantificação do grau de infiltrado inflamatório por tumores em porcentagem 30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica das barras da media $\pm$ desvio padrão dos graus do infiltrado inflamatório dentre os dois tipos de preservação sendo gip = parafina e gic = congelado ($p < 0,05$). 24

Figura 2. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD4. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD4 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD4 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....25

Figura 3. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD8. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD8 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD8 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....26

Figura 4. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD28. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD28 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD28 em carcinoma simples (aumento de 40x). ABC, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....27

Figura 5. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD152. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD152 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD152 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....27

Figura 6. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando carcinoma mamário de fêmea canina com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD56. A)

setas indicam imunomarcção CD56 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de CD56 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....28

Figura 7. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando carcinoma mamário de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti Foxp3. A) setas indicam imunomarcção de Foxp3 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de Foxp3 em carcinoma simples (aumento de 40x). LSAB, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.....29

Figura 8. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão da quantificação celular comparando as marcações entre os tipos tumorais sendo C.S.= carcinoma simples e C.D.= carcinoma complexo ($p < 0,05$).....30

Figura 9. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão (circulo verde indica mediana) da quantificação celular nos carcinomas simples para cada marcador, letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....31

Figura 10. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão (circulo verde indica mediana) da quantificação celular nos carcinomas complexos para cada marcador, letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....31

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Anatomia, morfologia e patofisiologia da glândula mamária

As glândulas mamárias correspondem ao produto de glândulas sudoríparas modificadas. Com o início da puberdade, ocorre a ação dos hormônios esteróides sexuais, seguindo-se uma fase de crescimento dos canais mamários e do estroma ou crescimento alométrico (DELOUIS & RICHARD, 1991). Devido ao efeito do estrógeno, o sistema tubular desenvolve-se durante a puberdade, com discreto aumento de células adiposas. Já a progesterona promove o desenvolvimento glandular, com proliferação das células epiteliais da porção terminal dos ductos intralobulares. Subsequentemente, ocorre a formação dos alvéolos secretores. Como o ciclo estral da espécie canina é caracterizado por uma fase progesterônica longa, que dura de 60 a 100 dias após o início da fase estrogênica, o hormônio em questão tem um papel crucial sobre as glândulas mamárias da cadela. Em animais gestantes ou não-gestantes, os lóbulos passam a substituir o tecido adiposo e o desenvolvimento lóbulo-alveolar é acompanhado por uma pequena atividade secretória. A estrutura canalicular passa a representar 90% do tecido ao final da gestação, em contraste com os 10% que representava no início da gestação (DELOUIS & RICHARD, 1991).

A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, denominadas torácicas craniais, torácicas caudais, abdominais craniais, abdominais caudais e inguinais, embora possa apresentar raramente apenas quatro pares (ZUCCARI et al., 2001). Estruturalmente, as glândulas mamárias são formadas por lóbulos (separados por septos conjuntivos), cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos (ductos lactíferos), que se abrem no teto, em número variável. O epitélio de revestimento dos ductos é duplo, com células cúbicas ou cilíndricas baixas. (ZUCCARI et al., 2001)

Os alvéolos das glândulas mamárias são compostos por epitélio luminal e basal, as células epiteliais luminais sintetizam e excretam proteínas lácteas e lipídeos durante a lactação, e as células basais ou mioepiteliais contraem-se, sob a influência da ocitocina, expelindo o leite. Além do tecido epitelial, fibroblastos e células adiposas

compõem e sustentam o tecido mamário. Essa formação é de extrema importância no estudo dos tumores mamários, pois existe uma relação direta entre seus componentes e o prognóstico da lesão (ZUCCARI et al., 2001). As células mioepiteliais são utilizadas como importante ferramenta no estudo da formação tumoral maligna e metastática (ZUCCARI et al., 2002). É observada distinta separação na linha média, entre as cadeias mamárias direita e esquerda.

A irrigação sanguínea das glândulas mamárias dos cães provém dos ramos externos das artérias torácica interna, intercostal e torácica lateral, da artéria epigástrica superficial cranial e das artérias epigástrica superficial caudal, epigástrica profunda cranial, abdominal segmentada, labial, e íliaca circunflexa profunda (ZUCCARI et al., 2002).

A drenagem venosa das glândulas é bastante similar à irrigação arterial, mas pequenas veias podem cruzar a linha média entre as glândulas direita e esquerda. Os linfáticos podem cruzar a linha média e penetrar nas paredes abdominais e torácicas (SLATTER, 1998). A drenagem linfática dos tumores mamários em cães é complexa, tendo sido demonstrado comunicações linfáticas entre a cadeia mamária direita e a cadeia mamária esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia em direção cranial e caudal. A drenagem pode seguir para a veia jugular comum ou formar conexões com os troncos traqueais e ducto torácico (GETTY, 1986). A glândula mamária torácica cranial drena somente para o linfonodo axilar através de um canal linfático isolado (RAHAL et al., 1995), enquanto que a torácica caudal pode drenar apenas para o linfonodo axilar (RAHAL et al., 1995) ou para o axilar e/ou inguinal (SAUTET et al., 1992). Já a glândula mamária abdominal cranial pode drenar para o linfonodo axilar, inguinal ou ambos (RAHAL et al., 1995). A glândula mamária abdominal caudal drena para o linfonodo inguinal (RAHAL et al., 1995) ou para o axilar e/ou inguinal (SAUTET et al., 1992). A glândula mamária inguinal drena apenas para o linfonodo inguinal (RAHAL et al., 1995).

Existem conexões linfáticas plexiformes entre as glândulas mamária torácica caudal e as abdominais, o que pode explicar a drenagem da glândula mamária torácica caudal para o linfonodo inguinal e da glândula mamária abdominal caudal para o linfonodo axilar (SAUTET et al., 1992). A existência de comunicações linfáticas

inconstantes contribui para a ocorrência de metástases linfáticas sem respeitar o sentido habitual da corrente linfática. O desenvolvimento de neoplasias mamárias é menos freqüente nas glândulas torácicas, sendo que a proporção aumenta gradativamente até as glândulas inguinais (SORRIBAS, 1995). Cerca de 60% dos tumores mamários estão localizados nas glândulas mamárias abdominais e inguinais, devido à maior quantidade de parênquima glandular, com maior atividade proliferativa responsiva ao estrógeno (MOULTON et al., 1970).

1.2 Neoplasias mamárias

Os tumores mamários dos canídeos são modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer (MOTTOLESE et al., 1994), pois o comportamento biológico e as características histopatológicas são semelhantes aos descritos na espécie humana (PELETEIRO, 1994). Em ambas as espécies, o sexo feminino é o mais afetado (MADEWELL & THEILEN, 1987), porém a fêmea canina apresenta três vezes mais tumores mamários quando comparadas às mulheres (BRODEY et al., 1983). Os indivíduos do sexo masculino raramente são acometidos (MADEWELL & THEILEN, 1987), relata-se incidência de 0 a 2,7% e alta probabilidade de malignidade (FOSSUM, 2002).

Quando comparado com os felinos, as neoplasias mamárias caninas são relativamente mais comuns e demonstram uma grande variedade de tipos morfológicos (FERRI, 2003).

1.3 Incidência e predisposição racial

Dentre as neoplasias mais frequentes que na espécie canina, destacam-se as neoplasias mamárias, as quais representam 25 a 50% de todas as neoplasias nas fêmeas caninas (DONNAY et al., 1989), 50% das neoplasias mamárias são malignas e em 25% desses casos, os animais já apresentam metástases no momento do diagnóstico (MORRISON, 1998). Os tumores de mama correspondem a 82% das neoplasias do aparelho reprodutivo da cadela (DONNAY et al., 1989). A frequência de

neoplasias mamárias aumenta após os seis anos de idade e o pico de incidência ocorre por volta dos dez a onze anos, média de 7,8 a 8,8 anos (JOHNSTON, 1998). MEUTEN (2002) e RUTTEMAN et al. (2001) descrevem predileção racial nas fêmeas de Poodle, Dachshund, Pointer, Retrievers, English Spaniel e Cocker Spaniel e WITHROW & MACEWEN (1996) afirmam que cães da raça Boxer, Grey Hound, Beagle e Chihuahua apresentam menor risco de desenvolvimento desta afecção.

1.4 Classificação das neoplasias mamárias

A nomenclatura dos tumores dá-se de acordo com sua célula e tecido de origem (epitelial ou mesenquimal), padrão de crescimento (glandular ou papiliforme) e comportamento biológico (benigno ou maligno, segundo características morfológicas e quadro clínico) (JONES et al., 2000).

A classificação dos tumores mamários ainda é controversa. BENJAMIN et al. (1999) estabeleceram uma classificação de acordo com as características morfológicas e comportamento de cada tipo de tumor. Segundo esta os tumores são divididos em benignos e malignos. Dentre os benignos estão o papiloma ductal (simples ou complexo), adenoma (simples ou complexo), tumor misto benigno, fibroadenoma e mioepitelioma. Os tumores malignos compreendem o adenocarcinoma (sólido, tubular e/ou papilar) (simples ou complexo), carcinoma ductular (de origem intralobular ou interlobular) (simples ou complexo), carcinoma de células fusiformes, carcinoma anaplásico, carcinoma de células escamosas, carcinoma mucinoso, mioepitelioma maligno, carcinoma ou sarcoma em tumor misto e carcinosarcoma (BENJAMIN et al. 1999).

1.5 Etiologia

Dentre as hipóteses relacionadas com a etiologia dos tumores mamários, pode-se citar uma possível origem viral, embora não tenha sido confirmada com segurança nas observações até hoje efetuadas, mas não deve ser totalmente descartada (ZUCCARI et al., 2001). Outra hipótese do desenvolvimento tumoral corresponde à

dieta. A alimentação caseira, principalmente no que se refere à alta ingestão de carnes de origem bovina e suína e pobre em carne de frango, apresenta correlação positiva com o desenvolvimento de neoplasias em fêmeas caninas (ZUCCARI et al., 2001; FERRI, 2003). A dieta com restrição calórica tem sido associada a uma redução no desenvolvimento de tumores mamários em animais (WILLETT, 2000). A ingestão de uma dieta rica em gordura, principalmente as poliinsaturadas, em modelos animais, possui um efeito promotor na tumorigênese (WILLETT, 2000). HATAKA et al. (2002) demonstrou-se que 55% das cadelas portadoras de neoplasias mamárias eram alimentadas com comida caseira-ração e 31% alimentadas somente com dieta caseira.

A hipótese do envolvimento de um componente etiológico de natureza hormonal tem sido a mais aceita. Os esteróides ovarianos são considerados como um dos fatores etiológicos dos tumores mamários em cadelas, pois quase todos os animais afetados são fêmeas, e a gonadectomia precoce diminui a incidência das neoplasias mamárias (FERRI, 2003). O estrógeno induz proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias propiciando condições necessárias para que mutações genéticas ocorram (ZUCCARI et al., 2001) e promove o crescimento celular por estimular a liberação do fator de crescimento tumoral α , do fator de crescimento semelhante à insulina e por inibir o fator de crescimento tumoral β (NORMAN & LITWACK, 1997).

A proliferação do sistema alveolar depende da progesterona, predominante no diestro (DONNAY et al., 1989). AMORIM & FERREIRA (2001) afirmam que o estrógeno e a progesterona não são mutagênicos, e inserem seus efeitos carcinogênicos, não causando dano direto ao DNA, e sim aumentando ou diminuindo as taxas de proliferação, atrofia ou diferenciação de células tronco ou intermediárias. O estrógeno e a progesterona atuam nas células alvo durante os estádios iniciais da carcinogênese mamária, mas perdem seus efeitos estimulatórios durante os estádios finais da doença (FERRI, 2003).

Receptores para estrógeno (ER), progesterona (PR) e prolactina (PRL-R) estão presentes no tecido mamário normal das fêmeas caninas. Tumores mamários benignos mostram positividade para ER, PR e PRL-R; ao contrário de neoplasias primárias malignas, que apresentam baixas concentrações desses receptores (RUTTEMAN, 1990). O crescimento de tecido mamário normal e ou neoplásico é estimulado por

hormônios esteróides e fatores de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento transformador (TGF- α) (MOL et al., 1996).

O efeito promotor da progesterona sobre as neoplasias mamárias nas fêmeas caninas depende de seu efeito estimulador sobre o hormônio do crescimento - GH. A progesterona aumenta a produção de GH nos cães, a qual pode ser o fator responsável pela indução do tumor mamário ou representa um efeito secundário da progesterona, sem relação com o fator promotor tumoral primário (RUTTEMAN, 1990). Concentrações elevadas de GH, juntamente com níveis crescentes de "insuline growth factor (IGF-I e II), estimulam o recrutamento das "stem cells" e proliferação e diferenciação celular como observada em outros tecidos (MOL et al., 1996). Muitos pesquisadores têm demonstrado uma forte associação entre o uso de esteróides ovarianos sintéticos e o desenvolvimento de neoplasias mamárias benignas e malignas. FERREIRA & AMORIM (2003) demonstraram através de estudos epidemiológicos e de toxicidade, que a utilização regular de esteróides ovarianos ou derivados sintéticos, em fêmeas ou em machos, aumenta em três vezes o risco de desenvolvimento de carcinomas e tumores benignos. O tratamento anticoncepcional à base de progestágenos em cadelas, promove em longo prazo a formação de alguns nódulos mamários hiperplásicos, que predis põem a transformação maligna do tecido (ZUCCARI et al., 2001).

Uma possível influência da glândula pituitária (hipófise) no tumor de mama canino também tem recebido atenção especial, visto que alguns relatos conflitantes foram publicados sobre a elevação dos níveis de prolactina em cães portadores de neoplasia. Sabe-se que a prolactina é necessária para a manutenção da atividade secretória, não desempenhando papel sobre a proliferação celular da glândula mamária, no entanto, tal hormônio estimula o crescimento do tumor mamário devido à sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo aumento no número de seus receptores, por facilitar a ação mitótica deste hormônio (FONSECA & DALECK, 2000). Entretanto, a possibilidade da prolactina estimular a atividade mitótica das células do epitélio mamário não pode ser descartada (MULDOON, 1981).

Cadelas com pseudogestação recorrente apresentam altos níveis de prolactina, predispondo à formação de tumores de mama; o leite retido cronicamente pode conter compostos químicos que possuam efeito carcinogênico sobre o epitélio adjacente

(ZUCCARI et al., 2001) e a hipóxia celular, resultante da distensão dos ácinos repletos de secreção láctea, leva à formação de radicais livres, os quais possuem efeito na carcinogênese (DONNAY et al., 1994). Entretanto, a pseudogestação assim como a idade à primeira prenhez, número de gestações e ciclo estral irregular, são fatores contraditórios e ainda não foi confirmada suas relações com a carcinogênese mamária (FERRI, 2003).

Quando a gonadectomia é realizada antes do primeiro estro o índice de neoplasias mamárias é reduzido para 0,5%, 8% após o primeiro estro e 26% após o segundo estro. Depois dos dois anos e meio de idade, a gonadectomia não previne a ocorrência de neoplasias mamárias malignas, porém, reduz a incidência de neoplasias benignas (RUTTEMAN et al., 2001).

1.6 Métodos diagnóstico e prognóstico

O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia (MOTA & OLIVEIRA, 1999), e é considerado o exame mais confiável no diagnóstico de tumor mamário canino, permitindo tipificação, graduação, avaliação de fatores como infiltração vascular, cutânea e de tecidos moles, grau de diferenciação, índice mitótico e necrose (MISDORP et al., 1999).

Os locais de metástase mais comuns dos tumores mamários caninos incluem pulmão, fígado, rins, adrenais, baço, pâncreas, diafragma, ovários, coração, osso, uretra e mucosa vestibular, musculatura esquelética, olhos e cérebro (JOHNSTON, 1993) e, apesar de intensa investigação clínico-patológica, pouco se sabe sobre seu prognóstico (BENJAMIN et al., 1999). É difícil correlacionar estágio clínico, diferenças no critério histomorfológico, e prognóstico clínico das neoplasias mamárias (BENJAMIN et al., 1999).

Prognósticos acurados e adicionais são requeridos para auxiliar na identificação de pacientes de alto risco. Estudos da biologia do tumor têm identificado inúmeros marcadores que podem ser a base para desmistificação do tumor (GRAHAM & MYRES, 1999) e identificação de um prognóstico mais exato, como avaliação da proliferação

celular (ki-67) (YANG et al., 2006), expressão de receptores hormonais (NIETO et al., 2000) e expressão aberrante da proteína supressora de tumor P53 (LEE et al., 2004).

1.7 Sistema imune

Nos animais e no homem a resposta imune pode interferir no desenvolvimento de neoplasias por meio de regressão espontânea do tumor e a presença de um infiltrado associado (MACEWEM, 1990). Entretanto, o sistema imune muitas vezes é insuficiente e não impede o desenvolvimento de neoplasias letais que se desenvolvem em indivíduos imunocompetentes (ABBAS et al., 2004). Tumores malignos expressam antígenos que podem estimular e servir de alvos para a imunidade tumoral, podendo ser divididos em antígenos tumor específicos que são expressos exclusivamente pelas células tumorais, estimulando a rejeição de tumores transplantados e demonstrados somente em animais; e antígenos associados a tumor, que são encontrados em células normais, mas que se acumulam em células tumorais (CHAMMAS et al., 1999).

Um dos sistemas de defesa do organismo animal consiste em mecanismos químicos e celulares coletivamente conhecidos como sistema imune inato. Um aspecto chave da imunidade inata é a habilidade do organismo de focalizar a invasão bacteriana e causar inflamação. Nela trocas locais nos tecidos são produzidas pela invasão microbiana ou como resultado de dano tecidual pelo aumento de fluxo sanguíneo e acúmulo de células que podem atacar e destruir antígenos (TIZARD, 2002). A imunidade inata tem como componentes principais os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs), complemento e células Natural Killer (NK). Os neutrófilos e macrófagos podem fagocitar e lisar células através da citotoxicidade mediada por anticorpos dependentes de citotoxicidade celular (ADCC), quando ligados a tumores, e secretar inúmeras citocinas com efeitos diretos (fator de necrose tumoral, TNF) ou indiretos (IL-12 e IL-18) no desenvolvimento tumoral (JAKOBISIAK et al., 2003). Além da imunidade inata, o sistema imune adquirido desenvolve sua participação por meio da imunidade adaptativa, composta pelos linfócitos B e T e da co-participação de células da imunidade inata (DUNN et al., 2004). A resposta adquirida reconhece os antígenos

quando encontrados pela segunda vez e responde de maneira mais rápida e efetiva (DUNN et al., 2004).

A técnica de imunoistoquímica tem sido bastante utilizada na medicina humana para caracterizar as células inflamatórias associadas a neoplasias, e determinar se a resposta local está correlacionada ao prognóstico (GAO et al., 2007).

Cães com resposta linfocitária na localização do tumor apresentam 45% de chance de recidivas ou desenvolvimento de metástase no prazo de dois anos, quando comparados a 83% em cães com baixa resposta linfocitária (BIRD et al., 2008). O estudo e a identificação molecular de antígenos expressos pelas células tumorais devem ser realizados com o objetivo de reconhecer as células T antitumorais e desenvolver imunoterapias antígeno-específicas. Trabalhos experimentais, *in vitro* e *in vivo* de neoplasias mamárias caninas demonstram semelhanças com tumores mamários humanos em relação ao comportamento biológico, resposta a agentes citotóxicos, e características histológicas. Desta forma, as neoplasias mamárias em fêmeas caninas são úteis na pesquisa do câncer mamário humano, no que se refere a diagnósticos mais precisos, prognósticos mais exatos e procedimentos terapêuticos mais eficientes (MARTINS et al., 2002).

A busca de métodos terapêuticos e profiláticos mais eficazes contra o câncer resultou em grande impacto no entendimento das bases imunológicas da oncologia. A descoberta dos antígenos tumorais e dos mecanismos de escape tumoral da vigilância imunológica revolucionou a compreensão da atuação do sistema imune na gênese e desenvolvimento tumoral. As proteínas parecem ser a chave do processo tumoral, permitindo um melhor entendimento do sistema imune como um regulador final da sua origem, desenvolvimento e/ou destruição das neoplasias (PIEKARZ et al., 2006).

1.8 Células T CD4 e CD8

Existem três populações distintas de células sensíveis a antígenos; as células T auxiliares que regulam as respostas imunes; as células T efetoras ou citotóxicas que destroem os antígenos endógenos; e as células B, que produzem anticorpos para destruir os antígenos exógenos (TIZARD, 2000). As células T expressam diferentes

proteínas de membrana, as quais servem como marcadores fenotípicos de diferentes populações linfocitárias e atuam em funções importantes e na ativação da resposta imune celular. As moléculas denominadas CD (*Cluster of Differentiation*) são reconhecidas por um agrupamento de anticorpos monoclonais que podem ser usados para identificar a linhagem ou o estágio de diferenciação dos linfócitos (KERREBIJN et al., 1999). As duas funções mais freqüentemente atribuídas aos diferentes antígenos CD são de promover as interações entre as células e sua aderência, e enviar sinais que levem à ativação da resposta imune celular (SUGAMURA et al., 1995). O reconhecimento antigênico depende de receptores para antígeno (TCR) presentes na membrana dos linfócitos T, que interagem com os antígenos na superfície das células-alvo. As células apresentadoras de antígenos (APCs) constituem uma população especializada no processamento e apresentação de antígenos, uma vez que interiorizados, são expressos na membrana em conjunto com moléculas classe II do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos capazes de reconhecer esta configuração (antígeno (Ag) + MHC classe II) pertencem à classe de linfócitos auxiliares (helper) e caracterizam-se pela presença da molécula CD4 em sua membrana. Uma vez efetuado o reconhecimento do antígeno, esta classe de linfócitos CD4 ativa macrófagos para destruir microrganismos fagocitados, prolifera e secreta uma série de citocinas que são capazes de ativar outras populações celulares, dentre elas os linfócitos da classe citotóxica, denominado CD8, que destroem as células infectadas por microrganismos intracelulares e são capazes de reconhecer antígenos apresentados em células-alvo, em conjunto com moléculas da classe I do MHC. Seu potencial citotóxico dirigido contra antígenos tumorais constitui um dos principais mecanismos efetivos na imunidade antitumoral e tem sido explorado em vários estudos. (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A caracterização de células associadas ao infiltrado inflamatório, foi descrita em cães acometidos por linfoma (SUEIRO et al., 2004), histiocitoma (KIPAR et al., 1998), tumor venéreo transmissível (PEREZ et al., 1998), carcinoma inflamatório e carcinoma nasal. Em gatos a caracterização foi descrita em carcinoma de células escamosas, carcinoma inflamatório (VANHERBERGHEN et al., 2009), queratose actínica (PEREZ et al., 1999) e carcinoma nasal. Estudos demonstraram expressão de CD8 e CD4 em

infiltrado linfocitário de adenocarcinomas mamários em humanos, mas não demonstraram expressão significativa de NK (CHIN et al., 1992; MOHAMADZADH et al., 2001). NOWAK et al., (2007) demonstraram pouca expressão de CD8 em adenocarcinoma mamário não metastático de cães, mas grande quantidade nesses tumores na presença de metástase. O'NEILL et al. (2009) demonstraram redução na expressão de CD8 no sangue de cães acometidos por neoplasia maligna, principalmente linfoma. BILIK et al. (1989) demonstraram correlação positiva entre quantidade de CD8 em infiltrado linfocitário no estroma de neoplasias mamárias em humanos, com metástase em linfonodos auxiliares. CHIN et al. (1992) verificaram que o aumento na taxa de CD4/CD8 em infiltrado linfocitário de carcinoma ductal mamário de humanos, está relacionado ao desenvolvimento de metástase em linfonodos, concluindo que a alta expressão de CD4 está relacionada a progressão tumoral. ITOH et al. (2009) demonstraram expressão reduzida de CD4 em sangue periférico de cães acometidos por neoplasia, quando comparados a cães normais, e que a expressão do CD4 é inversamente proporcional a progressão tumoral.

A contagem de células CD8 em cães com tumores no estágio inicial é semelhante à de cães normais, mas decresce com a progressão tumoral, refletindo o desenvolvimento da imunidade humoral. ITOH et al. (2009) concluem que a imunidade antitumoral é reduzida em cães com tumores em estágio avançado, quando comparada à imunidade de cães acometidos por tumores em estágios iniciais. Os resultados de CHIN et al. (1992) contradizem os resultados de ITOH et al. (2009), mas o primeiro estudo analisou expressão dessas células *in situ*, e o segundo em sangue periférico. SILVEIRA et al. (2009) demonstraram quantidade semelhante de CD4 e CD8 em amostras de tumor venéreo transmissível (TVT) de cães, coletados durante a fase de progressão e fase de regressão tumoral. GONZALEZ et al. (2000) demonstraram maior quantidade de CD4 e CD8 na fase de regressão, quando comparada a fase de progressão de TVT em cães. CASTRO et al. (2006) afirmam que ocorre diminuição no número de linfócitos TCD4+ e aumento de linfócitos TCD8+, macrófagos e células NK em pacientes com AIDS acometidos por *Pneumocystis carini*, concluindo que a imunossupressão relacionada à AIDS induz a diminuição de linfócitos TCD4+ e favorece a permanência de elevado parasitismo.

1.9 Células dendríticas

Células dendríticas são consideradas células apresentadoras profissionais de antígeno (APCs), bem como os linfócitos B e os macrófagos. São derivadas de células progenitoras da medula óssea e circulam por toda a corrente sanguínea como precursores imaturos (SPIOTTO et al., 2003). Elas captam os antígenos na periferia e migram para os linfonodos apresentando os antígenos aos linfócitos T CD4+ via MHC de classe II ou a CD8+ via MHC de classe I. Porém, acredita-se que a apresentação de antígeno ocorra mais facilmente via MHC de classe II e com baixa dose de antígenos (SPIOTTO et al., 2003). A ativação das células T CD8 é também iniciada pelo reconhecimento de antígenos em APCs especializadas nos órgãos linfóides periféricos. É provável que as células dendríticas ingiram células infectadas ou células tumorais, processam e apresentam os antígenos, dos microrganismos ou tumores para reconhecimento por linfócitos T CD8, sendo este processo denominado de apresentação cruzada (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Por isso, a ativação de células T CD8 parece exigir um co-estímulo mais forte que as células T CD4 e sua expansão clonal pode ser auxiliada pelas células T CD4 interagindo com a mesma molécula APC (JANEWAY, 2002).

A caracterização em humanos das moléculas dos complexos de histocompatibilidade maior MHC classe I e II (CHAMULEAU et al., 2006), células T (GAO et al., 2007), macrófagos e células dendríticas tem sido reportada em vários estudos. Infiltrados de células T ou células dendríticas em carcinomas, estão associados a melhores prognósticos (CAI et al., 2006).

1.10 Receptores co-estimulatórios e inibidores da família CD28

O CD28 é uma proteína de membrana que transduz sinais que funcionam conjuntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR para ativar as células T *naïves*. Uma propriedade geral das células T e B *naïves* é que elas precisam de dois sinais extracelulares distintos para iniciar sua proliferação e diferenciação em células

efetoras. O primeiro sinal é fornecido pela ligação do antígeno ao receptor antigênico, e é essencial para garantir a especificidade da resposta imunológica subsequente. No caso das células T, a ligação dos complexos peptídeos-MHC ao TCR (e ao co-receptores CD4 e CD8) gera o primeiro sinal. O segundo sinal para a ativação das células T é gerado por moléculas co-estimuladoras e os mais bem definidos para os linfócitos T são constituídos por um par de proteínas relacionadas chamadas de B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são expressas nas células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Esses co-estimuladores B7 são reconhecidos nas APCs por meio de receptores específicos nas células T (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

O primeiro desses receptores para B7 descoberto é a molécula CD28, expressa em mais de 90% das células T CD4 e em 50% das células T CD8 em humanos. A ligação das moléculas B7 das APC ao CD28 promove sinais para a célula T que induzem a expressão de proteínas antiapoptóticas e estimulam a produção de fatores de crescimento e de outras citocinas, promovendo ainda a diferenciação e proliferação dessas células T. Assim, a CD28 é o principal receptor co-estimulador para liberar os segundos sinais para a ativação de células T.

O segundo receptor para moléculas B7 foi descoberto mais tarde e é chamado de CTLA-4 (CD152). O CTLA-4 é estruturalmente homólogo ao CD28, mas é expresso nas células T CD4 e CD8 recentemente ativadas, e sua função é inibir as células T. A maneira pela qual os dois receptores liberam sinais opostos, embora reconheçam as mesmas moléculas B7 das APCs, é uma intrigante questão e motivo de ativa pesquisa (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

DECEUNYNCK et al. (1994) demonstraram valores sanguíneos altos de CD28 em pacientes com mieloma múltiplo na fase aguda da doença, mas não demonstraram expressão na fase crônica ou em pacientes normais. NAKAZAWA et al. (1999) não detectaram CD80 na mucosa do cólon de pacientes humanos acometidos por colite ulcerativa, concordando com os resultados de BLOOM et al. (1995) em estudos com humanos acometidos por doença inflamatória intestinal e com estudos de SANDERSON et al. (1993) em camundongos. Em contraste, NAKAZAWA et al. (1999) demonstraram através de imunoistoquímica, alta expressão de CD86 em mucosa de cólon inflamada de pacientes humanos acometidos por colite ulcerativa, mas não

demonstrou expressão em mucosa de pacientes com câncer, pacientes com colite ulcerativa em estágio remissivo e pacientes com doença de Crohn's, sugerindo que a expressão de CD86 é induzida por citocinas inflamatórias.

ZANG et al. (2003) afirmam que as moléculas B7 desenvolvem importante papel na proliferação das células T antígeno específicas, e observaram redução na expressão das moléculas B7 em cães infectados com *Leishmania infantum* quando comparados aos cães não infectados. DORFMAN et al. (1997) demonstraram expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 em linfonodos de humanos acometidos por linfoma folicular, linfoma de células difusas e linfoma de células não clivadas, mas não demonstrou expressão em linfonodos de pacientes acometidos por linfoma de células do manto e por linfoma linfocítico.

O CTLA-4 é o segundo receptor de células T para B7, que desempenha função de inibição da regulação das respostas das células T. Vários estudos têm demonstrado in vitro, que soluções de anti-CTLA-4 podem melhorar as respostas das células T, bloqueando o ciclo de progressão celular, reduzindo a expressão de citocinas e proliferação celular (LINSLEY et al., 1993).

A identificação do CTLA-4 em camundongos acometidos por desordens linfoproliferativas fatais demonstrou que o CTLA-4 regula de forma negativa, através de um sinal inibitório, a resposta das células T, e que o bloqueio do CTLA-4 aumenta a ativação das células T (ZOUAIN et al., 2004). CONTARDI et al. (2005) demonstrou expressão de CTLA-4 em diferentes tipos de linhagens celulares derivadas de tumores em glândula mamária, pulmão, cólon, rins, ovários, útero e bexiga de humanos, como carcinoma, osteo/rabdomiossarcoma, neuroblastoma e melanoma, evidenciando grande intensidade na marcação em osteossarcoma e carcinoma de glândulas mamárias.

1.11 Células T regulatórias

As células T regulatórias (TREGS) de ocorrência natural estão relacionadas com a manutenção da autotolerância e são de grande importância para a manutenção da homeostase do sistema imunitário (BAECHER-ALLAN & HAFLER, 2005). São

comprometidas com a inibição da ativação e expansão de linfócitos auto-reativos nos tecidos periféricos (SAKAGUCHI, 2004) e apresentam capacidade inibitória com comprovado papel na regulação negativa da resposta imune também diante de antígenos exógenos e auto-antígenos. SAKAGUCHI et al. (1995) relataram as células TREGS como linfócitos T $CD4^+$ que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25) e são responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos.

O interesse no estudo das TREGS deve-se à função-chave dessa população celular na manutenção dos mecanismos de autotolerância e na regulação da resposta imune (SAKAGUCHI, 2004). As TREGS representam 5% a 10% do total de células $CD4^+$ no sangue periférico (BEACHER et al., 2001). Há evidências de que os timócitos $CD4^+CD25^+$ são selecionados no timo a partir de interações com peptídeos próprios apresentados por moléculas de MHC-II (ITOH et al., 1999) e que a seleção positiva dessas células depende de interações de alta afinidade com auto-antígenos expressos em moléculas de MHC (JORDAN et al., 2001). Ainda é controverso o mecanismo pelo qual as TREGS escapam à seleção negativa, mas acredita-se que estas, uma vez selecionadas positivamente por meio de reconhecimento de alta afinidade de peptídeos próprios, produzam moléculas anti-apoptóticas que as protegem da seleção negativa (MAGGI et al., 2005).

Estudos iniciais caracterizavam fenotipicamente as TREGS com base apenas na expressão constitutiva dos marcadores CD4 e CD25 (Foxp3), embora seja conhecido que qualquer outra célula T $CD4^+CD25^-$ possa, uma vez ativada, expressar transitoriamente a molécula CD25 (SAKAGUCHI, 2004). É possível se observar, dentro da população $CD4^+CD25^+$, uma população mais abundante, expressando baixos níveis de CD25, e uma população menos numerosa, com elevada intensidade de expressão desse receptor (BEACHER et al., 2001). Esta última população, com intensa expressão de CD25, corresponde ao *pool* de TREGS. O CD25 representa, ainda, na fisiologia dessa célula, componente indispensável para sua geração e manutenção no organismo (SAKAGUCHI, 2004).

A principal função das TREGS é regular negativamente as respostas imunes, inibindo várias células, tanto relacionadas à imunidade inata quanto à adaptativa (ITOH

et al., 1999). Em camundongos saudáveis a taxa de TREGS sanguínea varia de 5 a 10% de todas as células T CD4, e exerce função de supressão nas células T efectoras, tanto CD4 como CD8 e células apresentadoras de antígenos. As células T regulatórias (CD4 e CD25) apresentam-se aumentadas na presença de doença infecciosa crônica ou neoplasia em humanos e animais (VANHERBERGHEN et al., 2009). Nessas situações, as células T regulatórias exercem função deletéria na supressão de respostas imunes benéficas. Um aumento nas células T regulatórias é verificado no sangue, linfonodos e tecidos tumorais em humanos acometidos por melanoma, linfoma e diferentes tipos de neoplasia maligna no pulmão, glândula mamária, ovário e fígado (STAGG et al., 2007). Em humanos com câncer, vários estudos demonstraram a correlação no aumento das células T regulatórias com a piora do quadro clínico (BAECHER-ALLAN & ANDERSON, 2006). Cães acometidos por neoplasia maligna apresentam maior expressão de células T regulatórias quando comparados a cães normais e a porcentagem de células T regulatórias é ainda maior em cães acometidos por carcinoma (O'NEILL et al., 2009).

1.12 Células NK

As células NK são uma subpopulação de linfócitos que não requerem proliferação para sua atuação. Muitos estudos têm mostrado que a atividade de células NK contra células tumorais, está correlacionada com a não expressão ou a redução na expressão de moléculas de MHC, principalmente o MHC de classe I, fenômeno este conhecido como “missing self”. As células NK induzem citólise de células alvos que não expressam um marcador típico do “self”, o MHC I. Essas células não possuem especificidade anti-tumoral, elas apresentam apenas o receptor de superfície para fragmento Fc das imunoglobulinas G (IgG) circulantes (CD16 ou FcRI). Se as IgGs circulantes corresponderem a anticorpos contra antígenos tumorais, as células NK poderão reconhecer a célula tumoral revestida de anticorpos e exercer sobre ela uma ação citolítica ou citostática pela citotoxicidade mediada por anticorpos dependentes de citotoxicidade celular (ADCC), provocando poros nas células via produção de perforina. Essa mesma ação citolítica pode induzir apoptose em células tumorais, via dependente

ou não de caspases, além desse mecanismo de morte, a célula NK possui a via CD95L-CD95 (Fas Ligante–Fas ou TNF-RTNF), as quais estão presentes nas membranas das células imunológicas e em células tumorais (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

As células NK produzem uma variedade de citocinas, incluindo IFN- γ que pode ativar macrófagos, e são ativadas na presença de fatores co-estimulatórios como IL-12, IL-2, IL-15 ou IFNs em resposta a condições inflamatórias. Com todas essas características, as células NK podem atuar cooperando com a imunidade adaptativa, detectando rapidamente e eliminando células potencialmente danificadas (JAKOBISIAK et al., 2003). LIU et al. (2006) demonstraram que as neoplasias mamárias se comunicam com as células NK através da produção de exossomos pelo tumor e que as células neoplásicas são capazes de inibir a ativação das NK promovendo o crescimento e desenvolvimento tumoral. Pacientes livres de câncer, com células NK funcionais no sangue periférico tem maior tempo de sobrevida sem ocorrência de metástases quando comparados aos pacientes com baixa atividade de células NK (PROSS & LOTZOVA, 1993). HARVELL et al. (2003) demonstram que as células NK representam menos de 10% de infiltrados inflamatórios benignos, podendo não existir expressão das células NK; entretanto, não é um marcador específico para desordens linfoproliferativas agressivas (DIETL et al., 1993), confirmando resultados encontrados em outros estudos em diferentes tipos de neoplasias malignas em humanos, afirmaram predominância de células T e macrófagos em disgerminoma ovariano humano, quando comparado as células B e natural killer. VAQUERO et al. (1990) demonstraram pouca quantidade de células NK em germinomas primários intracranianos em humanos, assim como VAQUERO et al. (1989) demonstrou em glioblastomas, sugerindo discrepância entre a quantidade de infiltrado linfocitário e infiltração de células NK nos tumores.

2. OBJETIVOS

O infiltrado inflamatório tem sido estudado por diversos autores em várias afecções, como neoplasias, afecções bacterianas, doenças autoimunes, afecções parasitárias, entre outros, relacionando as alterações encontradas com o grau da resposta inflamatória presente nas lesões, principalmente os CD4⁺ e CD8⁺, que são os mais encontrados, contribuindo para a fisiopatologia da doença. Não existem estudos que caracterizam a expressão da imunidade celular, a coestimulação celular e imunidade inata, correlacionando os achados com a eficácia da estimulação e defesa do sistema imune na presença de neoplasia mamária em fêmeas caninas. Com o presente estudo objetivou-se avaliar a expressão de moléculas associadas à resposta imunológica, células CD4, CD8, Foxp3 (CD4⁺CD25⁺), CD28, CD80, CD86, CD152 e NK (CD56), em carcinomas mamários de fêmeas caninas para caracterizar a resposta imune celular nesses tumores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material

Foram coletadas amostras de tumores de mama de 20 fêmeas caninas atendidas no Setor de Oncologia Veterinária e Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de mastectomia radical unilateral e ovariectomia (OH) no Setor de Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV/UNESP. Foram utilizadas 20 amostras de tumores classificados como carcinomas segundo MISDORP et al. (1999). Diferentes fragmentos foram fixados de duas maneiras: em solução de formalina 10% tamponada, por 24 horas e posterior imersão em álcool 70% por 24 horas e submetidos ao processamento histológico de rotina para inclusão em bloco de parafina, cortados a 4µm e fixados em lâminas polarizadas (Lâminas Positive Charged Amitel – REF 3450E025076112); imersos em N-hexano (Labsynth Co, Diadema, SP, BR), congelados e mantidos em nitrogênio líquido à 120°C negativos. Os fragmentos foram cortados a 5µm no criostato (Damon/IEC Division 3398 Microtome Cryostat) à 20°C negativos, em secções seriadas transversais, fixados em lâminas polarizadas (Lâminas Positive Charged Amitel – REF 3450E025076112) e armazenadas em freezer à 20°C negativos.

3.2 Processamento das amostras

As amostras foram processadas e coradas com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lyson conforme descrito por TOLOSA et al. (2003), de acordo com a rotina do Departamento de Fisiologia e Morfologia Animal da FCAV/UNESP. Os laudos foram realizados pela Prof^a Dr^a Rénee Amorim Laufer, do Departamento de Patologia

Veterinária da FMVZ/UNESP – Botucatu, sendo classificados em carcinoma simples (n=10) e carcinoma complexo (n=10).

3.3 Imunoistoquímica dos cortes em parafina

Os anticorpos utilizados para técnica de imunoistoquímica em parafina compreendem o Foxp3 (1/4000, Everest Biotech, policlonal), CD28 (1/20, Santa Cruz Biotechnology Inc., clone SC1623) e NK (1/75, Biotech, clone BC56C04) (tabela 1).

O método de imunoistoquímica utilizado compreende o complexo estreptoavidina biotina (ABC) desenvolvido por HSU et al. (1981). As lâminas com os cortes em parafina foram colocadas em estufa a 60°C por uma hora. A desparafinização e a desidratação foram realizadas em baterias de xilóis e alcoóis em concentrações decrescentes. Para a recuperação antigênica, os anticorpos Foxp3, CD56 e CD28 receberam tampão Citrato (pH 6,0 em panela de pressão (PASCAL®-DAKO) 125°C por 30 segundos). Após a recuperação antigênica e resfriamento dos cortes, as lâminas, receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (metanol + H₂O₂ 8%) para bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem dos cortes, o CD56 foi incubado com Protein Block (DakoCytomation, Ref. N1698-1) por 30 minutos e os CD28, Foxp3 incubados em leite desnatado a 3% (molico®), por 60 minutos, para bloqueio das proteínas inespecíficas.

Em seguida, foram incubados por 18 horas (over night) a 4°C com o anticorpo primário diluído em Antibody Diluent with Background Reducing (Dako - REF S3022-1) em câmara úmida e o Foxp3 incubado apenas por 2 horas a 36°C. Para detecção dos anticorpos foi utilizado o kit LSAB (Sistema de Detecção Ultra Estreptavidina Universal, DakoCytomation, Ref. K0690), por 30 minutos para o anticorpo Foxp3, kit Vectastain ABC Universal (Kit vectastain ABCkit Universal PK-6200, Vector), por 30 minutos para o anticorpo CD28, e Envision+Dual Link System HRP (Dako - REF K4061-1) para o anticorpo CD56.

Após cada um dos tratamentos recebidos, as lâminas foram lavadas em solução TRIS, pH 7,4 três vezes por cinco minutos cada, excetuando-se a etapa entre o bloqueio das proteínas inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário. As

reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Cód. SK-4100 - DAB Vector Laboratórios, Burlingame, CA, EUA), e contracolorados pela Hematoxilina de Harris por 40 segundos, e então lavados em água corrente por 10 minutos. A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de alcoóis e xilóis, seguidas pela montagem em lâminula em meio permanente Entelan (Ref. 1079610100, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany).

3.4 Imunoistoquímica dos cortes congelados

Os anticorpos utilizados para técnica de imunoistoquímica com cortes congelados compreendem o CD4 (diluição 1/10, VMRD, clone DH29A), CD8 (diluição 1/10, VMRD, clone CAD046A), CD152 (1:50, BD Pharmingen, clone BNI-3) (tabela1).

As lâminas com os fragmentos congelados foram descongeladas à temperatura ambiente, os cortes fixados em acetona gelada por 10 minutos e então lavados por 10 vezes em água deionizada. Após lavagem, os cortes foram incubados em leite desnatado 3% (molico®) para bloqueio das proteínas inespecíficas por 60 minutos e em seguida incubados por 18 horas (over night) a 4°C com o anticorpo primário diluído em Antibody Diluent with Background Reducing (Dako - REF S3022-1) em câmara úmida. Após incubação receberam o tratamento com peróxido de hidrogênio para bloqueio da peroxidase endógena. Para detecção dos anticorpos foi utilizado Envision+Dual Link System HRP (Dako - REF K4061-1). Após cada um dos tratamentos recebidos, as lâminas foram lavadas em solução TRIS, pH 7,4, três vezes por cinco minutos cada, excetuando-se a etapa entre o bloqueio das proteínas inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Cód. SK-4100 - DAB Vector Laboratórios, Burlingame, CA, EUA), e contracolorados pela Hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavados em água corrente por 10 minutos. A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de alcoóis e xilóis, seguidas pela montagem em lâminula em meio permanente Entelan (Ref. 1079610100, Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). Como controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por tampão TRIS e para os controles positivos

foram utilizados tecidos obtidos de cão, como linfonodos, pâncreas e outros, de acordo com descrição na literatura de cada anticorpo a ser utilizado.

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica, tanto em tecido congelado quanto em tecido fixado em parafina, com o protocolo imunoistoquímico de acordo com cada anticorpo.

Anticorpo	Clone	Diluição	Bloqueio das proteínas inespecíficas	Incubação	Recuperação	Bloqueio da Peroxidas e Endógena	Complexo
CD152* BD Pharmingen	BNI-3	1/50	Molico® 3%	ON	-	Metanol + H2O2	Envision
CD28** Santa Cruz	SC1623	1/20	Molico® 3%	ON	Pascal® Citrato pH6.0	Metanol + H2O2	ABC
CD 56** Biotech	BC56C04	1/75	Protein Block	ON	Pascal® Citrato pH6.0	Metanol + H2O2	Envision
FOXP3** Everest Biotech	policlonal	1/4000	Molico® 3%	2 horas	Pascal® Citrato pH6.0	Metanol + H2O2	LSAB
CD4 VMRD*	DH29A	1/10	Molico® 3%	ON	-	Metanol + H2O2	Envision
CD8 VMRD*	CAD046A	1/10	Molico® 3%	ON	-	Metanol + H2O2	Envision

Anticorpos utilizados em tecidos congelados*

Anticorpos utilizados em tecidos fixados em parafina**

3.5 Análises quantitativas

Os cortes foram avaliados quanto à presença e grau do infiltrado inflamatório: 0 = ausente, leve = 1, moderado = 2 e intenso = 3, tanto nos cortes de parafina quanto nos cortes congelados. As células imunomarcadas para os anticorpos CD4, CD8, CD28, CD152 e Foxp3 foram classificadas em escores de 0 a 4, sendo 0= marcação negativa, 1 = < 25%, 2 = 26 a 50%, 3 = 51 a 75%, 4 = >75% com observação de 5 campos aleatórios como sugerido por (BORGES et al., 2010). A leitura foi realizada por dois observadores independentes e o resultado final dos casos discordantes foi

obtido pela análise em comum, com a finalidade de produzir um consenso. Quanto ao CD56 as análises foram feitas nas células tumorais imunomarcadas e classificadas em escores de 0 a 4, em que 0= < 5%, 1= 6 a 25%, 2= 26 a 50%, 3 = 51 a 75% e 4 = >75% (ALOYSIUS et al. 2010).

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise estatística computadorizada no software MiniTab 15®, por meio do teste não paramétrico t- Mann Whitney para amostras independentes e o nível de significância foi estabelecido como $P \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Grau de infiltrado inflamatório

Das 20 amostras coletadas todas apresentaram infiltrados inflamatórios no carcinoma simples fixado em parafina 50% das amostras apresentaram infiltrado inflamatório de grau 1, 10% de grau 2 e 40% de grau 3. Já nos carcinomas simples em tecido congelado, 50% apresentaram grau 1, 30 grau 2, e 20% grau 3. Nos carcinomas complexos em parafina 50% das amostras apresentaram infiltrado inflamatório de grau 1, 40% de grau 2 e 10% de grau 3. Já nos carcinomas complexo em tecido congelado 60% apresentaram grau 1, 20% grau 2, e 20% grau 3. O grau de infiltrado inflamatório foi similar nos cortes preservados em parafina e congelação (Fig. 1)

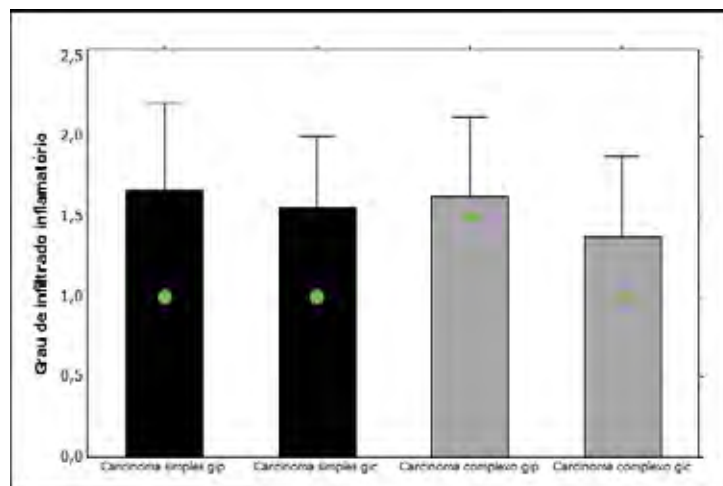


Figura 1. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão dos graus do infiltrado inflamatório dentre os dois tipos de preservação sendo gip = parafina e gic = congelado ($p < 0,05$).

4.2 Padrão de imunorreatividade para CD4

Os linfócitos que expressaram o CD4 estavam, na sua maioria, restritos no infiltrado inflamatório (Fig. 2), sendo encontrados pouca ou nenhuma vez dispersos pelo tumor. Sua marcação foi estritamente de membrana com intensidade de leve a moderado.

A imunomarcção do CD4 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), onde nenhuma amostra de carcinoma complexo teve quantificação de grau de grau 0, 50% de grau 1, 20% de grau 2, 20% de grau 3 e 10% de grau 4. Nos carcinomas simples 20% tiveram quantificação de grau 0, 10% de grau 1, 30% de grau 2, 20% de grau 3 e 20% de grau 4 (Tab. 2).

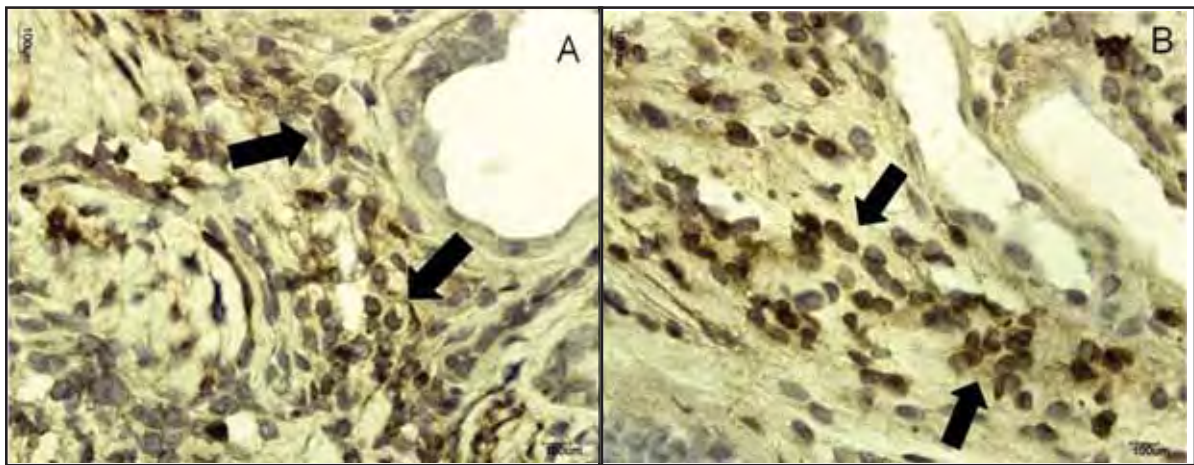


Figura 2. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD4. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD4 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD4 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

4.3 Padrão de imunorreatividade para CD8

Os linfócitos que expressaram o CD8 mantiveram-se similar ao CD4 quanto à localização (restrita ao infiltrado inflamatório) (Fig. 3), intensidade de marcação (leve a moderado) e marcação de membrana.

A imunomarcção do CD8 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), onde nenhuma amostra dos carcinomas complexos tiveram quantificação de grau 0, 30% de grau 1, 30% de grau 2, 40% de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4 e nos carcinomas simples 10% tiveram quantificação de grau 0, 20% de grau 1, 30% de grau 2, nenhuma amostra de grau 3 e 40% de grau 4 (Tab. 2)

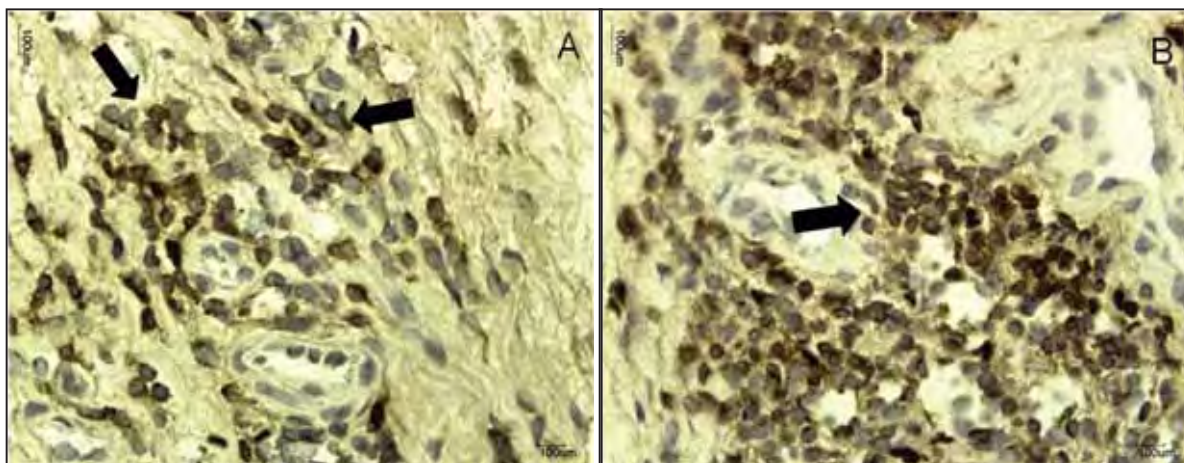


Figura 3. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD8. A) setas indicam imunomarcação de linfócitos TCD8 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcação de linfócitos TCD8 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

4.4 Padrão de imunorreatividade para o CD28

Os linfócitos que expressaram o CD28 mantiveram-se similar ao CD4 e CD8 quanto à localização (restrita ao infiltrado inflamatório) e a marcação (membrana) (Fig. 4). Quanto à intensidade de marcação o CD28, mostrou uma intensidade leve, moderada e intensa.

A imunomarcação do CD28 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), 20% das amostras dos carcinomas complexos tiveram quantificação de grau 0, 70% tiveram quantificação de grau 1, nenhuma amostra de grau 2, 10% de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4 e nos carcinomas simples 10% tiveram quantificação de grau 0, 70% apresentaram grau 1, 20% de grau 2, nenhuma amostra de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4 (Tab. 2)

4.5 Padrão de imunorreatividade para o CD152

Os linfócitos que expressaram o CD152 mantiveram-se similar ao CD4, CD8 e CD28 quanto à localização (restrita ao infiltrado inflamatório), marcação de membrana (Fig. 5) e diferente apenas do CD28 quanto intensidade de marcação (leve a moderado).

A imunomarcção do CD152 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), onde nenhuma amostra dos carcinomas complexos tiveram quantificação de grau 0, 20% de grau 1, 30% de grau 2, 30% de grau 3 e 20% de grau 4 e nos carcinomas simples nenhuma amostra apresentou quantificação de grau 0, 40% de grau 1, 30% de grau 2, 20% de grau 3 e 10% de grau 4 (Tab. 2).

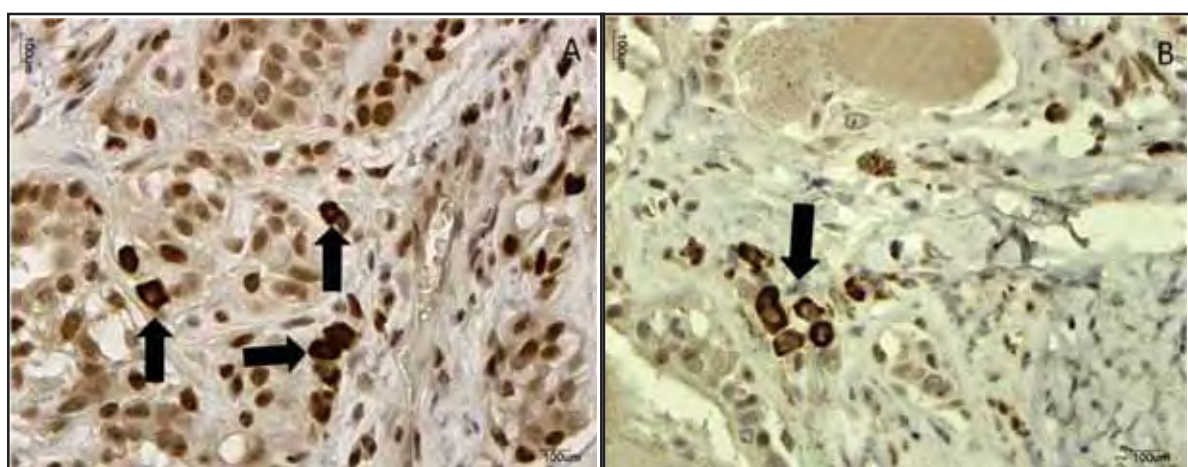


Figura 4. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD28. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD28 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD28 em carcinoma simples (aumento de 40x). ABC, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

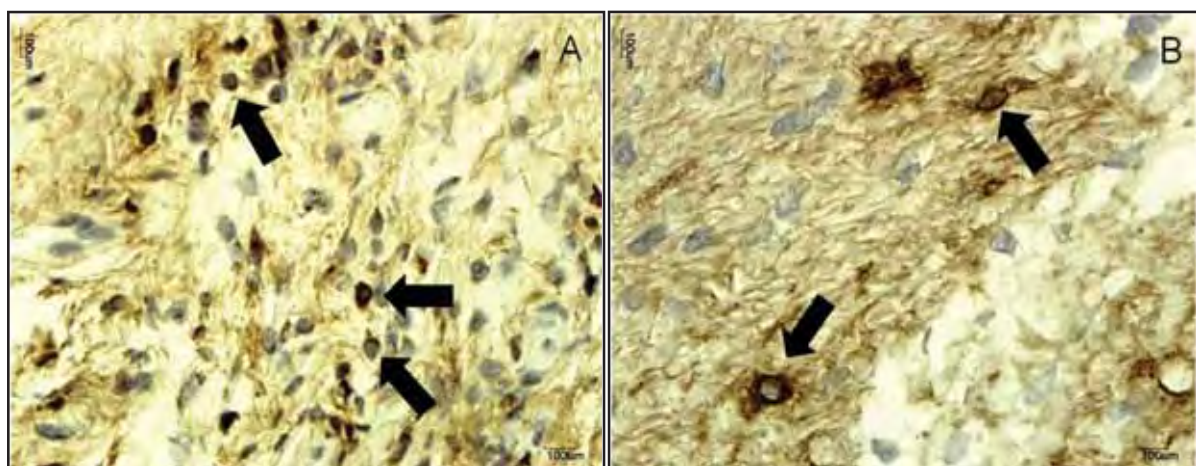


Figura 5. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando infiltrado inflamatório em tumor de mama de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD152. A) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD152 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de linfócitos TCD152 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

4.6 Padrão de imunorreatividade para o CD56

A imunomarcção do CD56 foi expressa na membrana das células epiteliais neoplásicas, diferente dos demais marcadores (Fig. 6). A intensidade de marcação variou de leve, moderado e intenso.

A imunomarcção do CD56 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), 50% das amostras dos carcinomas complexos tiveram marcação de grau 0, 10% tiveram quantificação de grau 1, 30% de grau 2, 10% de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4, e nos carcinomas simples 10% apresentaram quantificação de grau 0, 30% de grau 1, 20% de grau 2, 40% de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4 (Tab. 2)

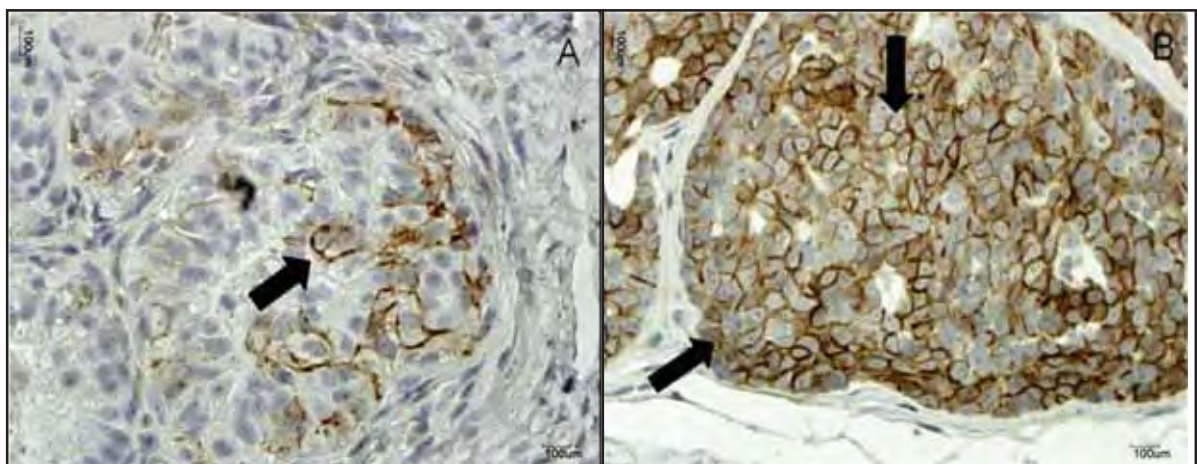


Figura 6. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando carcinoma mamário de fêmea canina com células imunomarcadas pelo anticorpo anti CD56. A) setas indicam imunomarcção CD56 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de CD56 em carcinoma simples (aumento de 40x). Envision, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

4.7 Padrão de imunorreatividade para o Foxp3

A imunomarcção do Foxp3 foi expressa no núcleo das células T-regulatórias que estavam difusas por toda a lâmina (Fig. 7). A intensidade de marcação variou de leve, moderado e intenso.

A imunomarcção do Foxp3 foi estatisticamente similar tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo (Fig. 8), onde 20% das amostras dos

carcinomas complexos tiveram quantificação de grau 0, 80% tiveram quantificação de grau 1, nenhuma amostra de grau 2, nenhuma amostra de grau 3 e nenhuma amostra de grau 4 e nos carcinomas simples 50% tiveram quantificação de grau 0, 50% de grau 1, nenhuma amostra de grau 2, nenhuma amostra de grau 3 e nenhuma mostra de grau 4 (Tab. 2)

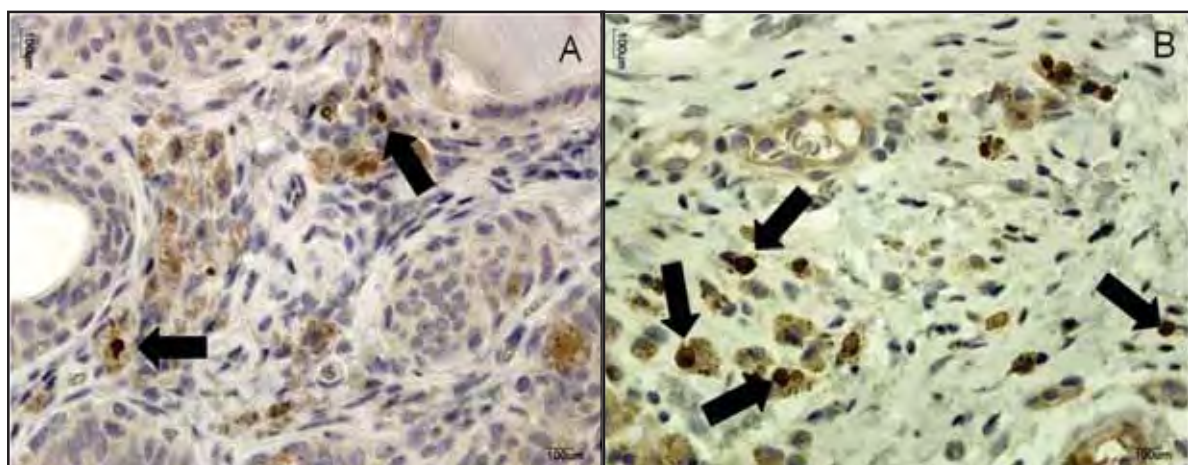


Figura 7. Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica demonstrando carcinoma mamário de fêmeas caninas com células imunomarcadas pelo anticorpo anti Foxp3. A) setas indicam imunomarcção de Foxp3 em carcinoma complexo, B) setas indicam imunomarcção de Foxp3 em carcinoma simples (aumento de 40x). LSAB, DAB, contracoloração Hematoxilina de Harris.

Tabela 2. Resumo das células imunomarcadas por tumores em porcentagem

Tipo Tumoral	Score	CD4 %	CD8 %	CD28 %	CD152 %	CD56 %	Foxp3 %
Carcinoma Complexo	Negativo	0	0	20	0	50	20
	<25%	50	30	70	20	10	80
	26 – 50%	20	30	0	30	30	0
	51 – 75%	20	40	10	30	10	0
	>75%	10	0	0	20	0	0
Carcinoma Simples	Negativo	20	10	10	0	10	50
	<25%	10	20	70	40	30	50
	26 – 50%	30	30	20	30	20	0
	51 – 75%	20	0	0	20	40	0
	>75%	20	40	0	10	0	0

Tabela 3. Resumo da quantificação do grau de infiltrado inflamatório por tumores em porcentagem

Tipo Tumoral	Score	Infiltrado inflamatório parafina	Infiltrado inflamatório congelado
Carcinoma Complexo	0	0%	0%
	1	50%	60%
	2	40%	20%
	3	10%	20%
	4	0%	0%
Carcinoma Simples	0	0%	0%
	1	50%	50%
	2	10%	30%
	3	40%	20%
	4	0%	0%

A quantificação das células imunomarcadas para todos os anticorpos apresentaram-se similares quando comparadas segundo o tipo tumoral (Fig. 8).

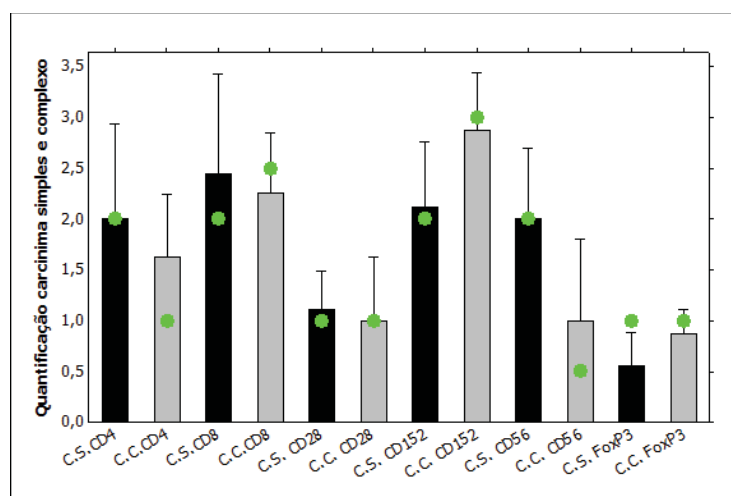


Figura 8. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão da quantificação celular comparando as marcações entre os tipos tumorais sendo C.S.= carcinoma simples e C.D.= carcinoma complexo ($p < 0,05$).

No caso dos carcinomas simples evidenciou-se diferença entre a quantificação das células imunomarcadas ($P < 0,05$), em que CD28 e Foxp3 foram estatisticamente iguais ($p = 0,06$) e menores que todas as demais marcações. (Fig. 9).

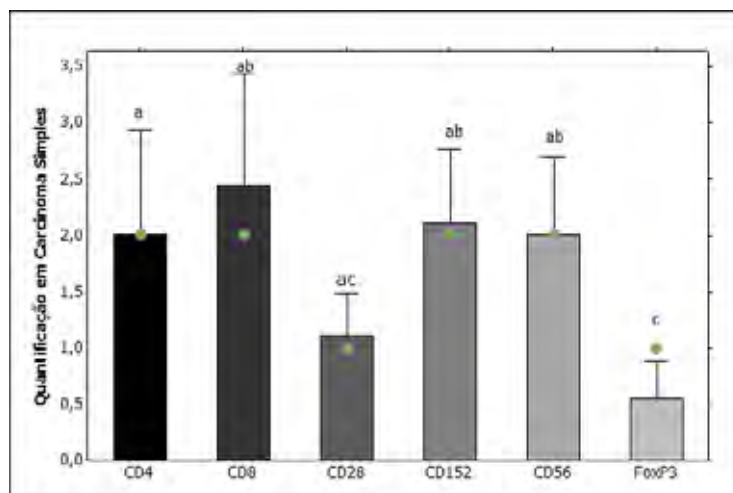


Figura 9. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão (circulo verde indica mediana) da quantificação celular nos carcinomas simples para cada marcador, letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Para os carcinomas complexos houve diferença entre a quantificação das células imunomarcadas ($P < 0,05$) onde o CD152 apresentou valor maior ($P = 0,01$) que as demais marcações com exceção do CD8 sendo este maior ($P = 0,02$) que CD28, ($p = 0,04$) para CD56 e ($P = 0,01$) para Foxp3, sendo esta ultima menor do que todos os outros marcadores (Fig. 10).

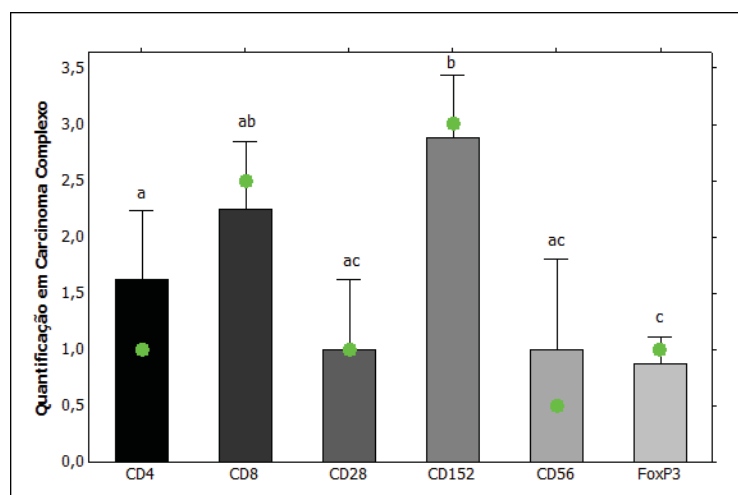


Figura 10. Representação gráfica das barras da média $\pm$ desvio padrão (circulo verde indica mediana) da quantificação celular nos carcinomas complexos para cada marcador, letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A condução de pesquisas com neoplasias mamárias justifica-se devido à elevada prevalência desta afecção em cadelas, representando cerca de 50% de todas as neoplasias que acometem fêmeas caninas (DONNAY et al., 1989) e, principalmente pelo semelhante comportamento biológico e características histopatológicas com o câncer de mama em mulheres (PELETEIRO, 1994). As cadelas são, portanto, modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer em humanos (MOTTOLESE et al., 1994), o que torna promissor, o estudo sobre os mecanismos fisiopatológicos e imunológicos deste tipo de neoplasia espontânea, no organismo do paciente.

O sistema imune mantém uma vigilância contínua do organismo para a presença de células anormais, que uma vez reconhecidas, são destruídas (BURNETT & THOMAS, 1959). O papel funcional do infiltrado linfocitário em cadelas acometidas por neoplasias mamárias ainda não está plenamente elucidado, mas a presença de infiltrado inflamatório no local do tumor é evidência de atividade imunológica contra o crescimento neoplásico (RUTTEN et al., 1990). MacEWEM, (1986) afirma que a presença de um infiltrado inflamatório associado à resposta imune de animais e humanos, pode interferir no desenvolvimento de neoplasias por meio de regressão espontânea do tumor.

O isolamento e estudo dos linfócitos em infiltrado inflamatório tumoral é difícil, e portanto, estudos recentes utilizam o método de imunoistoquímica em tecidos congelados de tumores mamários primários (GEORGIANNOS et al., 2003), objetivando o esclarecimento da resposta imune perante a neoplasia. Optou-se pela utilização da técnica de imunoistoquímica, muito utilizada na medicina humana, por caracterizar e quantificar as células inflamatórias associadas a neoplasias com menor possibilidade de erros (GAO et al., 2007; PRALL et al., 2004)

Os resultados encontrados, no presente experimento, evidenciam a importância do estudo de marcadores celulares no infiltrado inflamatório nas neoplasias mamárias, pois possibilitou determinar a presença, bem como quantificar a expressão de linfócitos CD4, CD8, CD4+CD25+, CD28, CD152 e células NK, caracterizando a resposta imune local intra-tumoral.

As amostras dos tumores coletadas para o presente estudo foram fixadas e conservadas em formaldeído 10% e emblocados em parafina, e também fixados em solução de N-exano e congelados. Não foram encontradas diferenças quanto à presença do infiltrado inflamatório nas amostras fixadas em parafina comparadas às amostras congeladas, descartando qualquer alteração ou possibilidade de erro quanto à quantificação de células imunomarcadas por anticorpos específicos para as técnicas de preservação testadas.

DEL CASTILLO (2002) afirma que as cadelas acometidas exclusivamente por neoplasias malignas, apresentam infiltrado inflamatório mais intenso em comparação às fêmeas acometidas por neoplasias malignas associadas ou não às benignas. No presente estudo, não houve diferenças estatísticas quanto à quantificação do infiltrado inflamatório entre os carcinomas simples e complexo.

As células com imunomarcação positiva para os anticorpos utilizados no presente estudo apresentaram coloração castanha devido a Diaminobenzidina (DAB), cromógeno utilizado nas reações de imunoistoquímica, variando de intensidade de acordo com cada anticorpo.

As células com imunomarcação positiva de membrana para os anticorpos CD4, CD8, CD28 e CD152 compunham o infiltrado inflamatório e o estroma ao redor das células tumorais. As células imunomarcadas pelo anticorpo Foxp3 apresentaram marcação nuclear e estavam dispersas no estroma tumoral e, o anticorpo CD56 resultou em imunomarcação positiva na membrana das células neoplásicas.

Os padrões de imunomarcação obtidos no presente estudo pelos anticorpos CD4 e CD8, foram iguais aos padrões encontrados por BADAUY (2003) e ALVES et al. (2010), porém, diferentes do padrão encontrado por TROMPIERE, (2009), que observou marcação citoplasmática dos linfócitos em carcinoma mamário de fêmeas caninas. O padrão de marcação em membrana observado neste experimento pode ser explicado pelo fato que os CDs (*Cluster of Differentiation*) se localizam na membrana dos linfócitos T e possibilitam identificação da linhagem ou estágio de diferenciação dos linfócitos (KERREBIJN et al., 1999).

5.1 CD4 e CD8

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$ t-Mann Whitney) na quantificação de células imunomarcadas pelo CD4 e CD8 nas amostras de carcinoma simples e complexo, mas observou-se maior imunomarcagem de linfócitos T CD8 em comparação aos linfócitos T CD4, independentemente do tipo tumoral. Entretanto nos carcinomas complexos a diferença do CD4 em relação ao CD8 é maior que nos carcinomas simples, como observado por DEL CASTILLO (2002).

Em pacientes humanos e caninos acometidos por neoplasias mamárias de alta malignidade histológica, a subpopulação de células CD8+ supera a de células CD4+ (DEL CASTILLO, 2002; GEORGIANNOS et al., 2003; SHEU et al., 2008). SHEU et al. (2008) afirmaram que o decréscimo nas linfócitos T CD4 em relação aos linfócitos T CD8 (CD4/CD8) aumenta com o grau de progressão tumoral, e se correlaciona com a penetração linfovascular e metástase linfonodal, desempenhando importante papel como fator prognóstico em neoplasias mamárias.

É possível que os linfócitos T CD4 não sejam necessários para ativação dos linfócitos T CD8, mas amplificam a resposta citotóxica dessas células (CHENG et al., 1998) e que a redução na proporção de linfócitos T CD4 em relação aos linfócitos T CD8, resulta em pobre resposta antitumoral (OCHSENBEIN et al., 1999).

O aumento na proporção de células T CD8 em relação aos linfócitos T CD4 observado no presente estudo nos indica que as células tumorais foram reconhecidas como antígenos e que houve ativação dos linfócitos T CD8 por citocinas liberadas pelos linfócitos T CD4, porém essa resposta antitumoral foi deficiente favorecendo a progressão tumoral.

A diferença em relação ao CD4 e CD8 foi aparentemente maior no carcinoma complexo em comparação ao carcinoma simples, concordando com os achados de SHEU et al. (2008), ou seja, com a progressão tumoral essa discrepância aumenta, nos levando a acreditar que com isso, a falha do sistema imune em reconhecer as células tumorais como antígenos seja maior quanto maior a malignidade histológica do tumor.

Entretanto, WHITESIDE et al. (1994), SCHONDORF et al. (1997) e NELSON et al. (2001) afirmaram que pode haver progressão tumoral mesmo com a apresentação de antígenos tumorais e a efetiva ativação das células T CD8.

Estudos atuais objetivam o desenvolvimento de imunoterapias adjuvantes contra neoplasia mamária baseando-se na imunidade celular mediada por citocinas com objetivo de induzir a resposta de linfócitos T CD8 (DAVIS, 2000).

5.2 CD28

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$ t-Mann Whitney) na quantificação de imunomarcção do anticorpo CD28 entre os carcinomas simples e complexo.

No carcinoma simples o CD28 apresentou-se significativamente menor que a quantificação do CD4 e CD8, porém não houve diferença estatística. Nas amostras de carcinoma complexo, o CD28 não apresentou diferença estatística quanto à quantificação de células imunomarcadas para o CD4, mas foi significativamente menor que o CD8 ($p < 0,04$).

O CD28 é uma molécula co-estimulatória primária expressa na maioria das células T por meio da interação com seus ligantes CD80 e CD86, transduzindo sinais que aumentam a ativação e proliferação dessas células (CARRARENO et al., 2002; FRAUWIRT, 2002).

Um decréscimo na expressão dos antígenos CD28 nos linfócitos T do sangue periférico foi descrita em pacientes com diferentes tipos neoplásicos (MELICHAR et al., 2000; FRYDECKA et al., 2004). Quando CD80 ou CD86 se ligam ao receptor CD28, um sinal co-estimulatório é produzido resultando em proliferação das células T e produção de interleucinas-2 (IL-2), por meio de vias que envolvem trifosfato inositol, a fosforilação da proteína tirosina e aumento dos níveis intracelulares de cálcio (LENSCHOW et al., 1996). Os leucócitos em neoplasias expressam menores níveis de antígenos CD80 e CD86 em comparação às células mononucleares do sangue periférico (MELISHAR et al., 2000), conseqüentemente há um menor estímulo de proliferação de linfócitos T.

ABBAS e LICHTMAN (2005) observaram que 90% da expressão de CD28 ocorrem no linfócito T CD4, mas 50% podem ser expressas no linfócito T CD8, o que

explica o fato de não ter havido diferença significativa ($p < 0,05$) entre a quantificação de células imunomarcadas pelo anticorpo CD4 e CD28 no carcinoma simples.

A possível explicação para a baixa quantificação do CD28 no presente estudo, é que o segundo sinal gerado por moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) para ativação das células T naíve pela expressão do receptor CD28 nos linfócitos T, já tenha sido gerado, o que pode ser evidenciado pela presença de linfócitos T CD8, ou, de fato há uma baixa expressão dessas células no infiltrado de tumores sólidos, reduzindo a ativação do sistema imune, que conseqüentemente favorece a progressão tumoral.

5.3 CD152

No carcinoma simples a quantificação das células marcadas pelo anticorpo CD152 foi estatisticamente igual ao CD4 e CD8 ($p \geq 0,05$) e maior que o CD28 ($p < 0,01$). No carcinoma complexo a quantificação das células CD152 foi semelhante estatisticamente que as células imunomarcadas pelo anticorpo CD8 ($p \geq 0,05$) e maior que todas as outras células imunomarcadas ($p < 0,05$). Esse resultado corrobora com os resultados de CONTARDI et al. (2005) que observou essas células aumentadas em carcinomas mamários de mulheres.

O CD152 (CTLA-4) é estruturalmente homólogo ao CD28, expresso nos linfócitos T CD4 e T CD8 recentemente ativadas, sendo um regulador negativo na proliferação e na função efetora de células T. A maneira pela qual os dois receptores liberam sinais opostos, embora reconheçam as mesmas moléculas B7 das APCs, é uma intrigante questão e motivo de ativa pesquisa.

A função negativa do CD152 ocorre por meio da interação com seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressas em células apresentadoras de antígeno resultando na inibição da liberação de IL-2, IFN- γ , IL-4 e inibição da expressão do receptor de progressão do ciclo celular (KUMMEL et al., 1996, CHAMBERS et al., 2001)

EGEN et al., (2002) relata que o nível de expressão do CTLA-4 é baixa nas células t naíve mas aumenta 2 a 3 dias após sua ativação, desempenhando papel crucial na regulação negativa das células T.

Em condições fisiológicas normais o CD152 desempenha função na tolerância periférica, por outro lado em portadores de tumores, o CD152 desempenha o papel de inibição da ativação das células T antitumorais (SMYTH et al., 2001).

Estudos em ratos com neoplasia demonstram que o bloqueio do CTLA-4 pode aumentar a imunidade contra esses tumores e obter um efeito antitumoral potente (SMALL et al., 2007, REUBEN et al., 2006), fato esse observado por ZOUAIN et al., (2004) que identificou o CTLA-4 em camundongos acometidos por desordens linfoproliferativas fatais e demonstrou que o CTLA-4 regula de forma negativa, através de um sinal inibitório, a resposta das células T, e que o bloqueio do CTLA-4 aumenta a ativação das células T.

MAO et al., (2010) analisou a expressão de CTLA-4 por imunoistoquímica em tecidos tumorais demonstrando que o CTLA-4 foi constitutivamente e altamente expresso em tumores mamários, corroborando com nossos achados.

Portanto é importante determinar sua expressão em tecidos tumorais e investigar o seu papel na iniciação e manutenção da neoplasia.

A possível explicação para nosso achado é que o segundo sinal gerado por moléculas co-estimuladoras B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) para ativação das células T naíve pela expressão do receptor CD28, expresso nos linfócitos T, já tenha sido gerado e que uma regulação de forma negativa, através de um sinal inibitório, a resposta das células T, se iniciou em ambos os casos, pois o CD152 é o segundo receptor de células T para B7-1(CD80) e B7-2 (CD86).

A alta expressão de CD152 nos casos dos carcinomas complexos, nos sugere que com a progressão tumoral os níveis de CD152 aumentam e consequentemente um aumento da regulação negativa do sistema imune, favorecendo a progressão tumoral.

5.4 Foxp3

A quantificação de Foxp3 nos carcinomas simples e complexo foi menor ($p < 0,05$) que todos os demais marcadores. Porém, observou-se que no carcinoma complexo houve uma maior quantidade de células imunomarcadas pelo Foxp3 em relação ao carcinoma simples.

SAKAGUCHI et al. (1995) relataram as células TREGS como linfócitos T CD4+ que expressam constitutivamente a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25), e são responsáveis pela supressão do desenvolvimento de doenças auto-imunes em camundongos. BEACHER et al., (2001) relataram que tais células representam 5% a 10% do total de células CD4+ no sangue periférico. JASON et al.,(2003) relatam que o fator de transcrição Forhead Box p3-Foxp3 é especialmente expresso em linfócitos T CD4+ CD25+.

O Foxp3 é um fator de transcrição envolvido na regulação supressora do sistema imune (FONTENOT et al.,2003; HORI et al., 2003), e portanto, desempenham função central na prevenção de afecções autoimunes causadas por resposta imune descontrolada após a infecção (SAKAGUCHI et al., 2006). Gatos com infecção crônica por FIV apresentaram maior proporção de linfócitos T-CD4+CD25+ favorecendo a replicação do vírus (VAHLENKAMP et al., 2004).

Em pacientes acometidos por neoplasias, a expansão dessas células pode ser induzida por elevadas concentrações locais de TGF-beta, que pode ser produzida pelo próprio tumor (FU et al., 2004). O TGF-beta induz os linfócitos T CD4 a tornarem-se linfócitos T CD4+CD25+, que por sua vez suprimem as células T citotóxicas e inibem a produção de anticorpos (YAMAGIWA et al., 2001, ZHENG et al., 2002).

O'NEILL et al., (2009) afirmaram que cães acometidos por neoplasias malignas apresentaram maior expressão de células T regulatórias quando comparados a cães normais, e a porcentagem de células T regulatórias é ainda maior em cães acometidos por carcinoma. Altos níveis de TREGs também foram identificados em tumores em fígado, pulmão, ovários, estômago, esôfago e recentemente em tumores mamário de humanos (WOO et al., 2001; ICHIHARA et al., 2003; CURIEL et al., 2004; ORMANDY et al., 2005; BATES et al., 2006).

O'NEILL et al., (2009) relataram aumento de células TREGs em relação a linfócitos T CD8 em cães com neoplasia, especialmente cães com linfoma. A alta proporção de células TREGS para T CD8 no tecido tumoral pode indicar pior prognóstico (Sato et al., 2005).

No presente estudo, a quantificação da imunomarcagem de Foxp3 foi menor em comparação aos outros marcadores, discordando dos resultados de VAHLENKAMP et

al. (2004) e O'NEILL et al. (2009). Acredita-se que as células tumorais não produziram concentração adequada de TGF-beta para expansão de Foxp3. A maior quantificação de Foxp3 no carcinoma complexo em relação ao carcinoma simples nos leva a crer que com a progressão tumoral, ocorre um aumento na quantificação desses marcadores e que a reduzida imunomarcção de Foxp3 encontrado no carcinoma simples, revela um prognóstico mais favorável para esse tipo de neoplasia mamária de fêmeas caninas.

Estudos em humanos com neoplasias sugerem que a porcentagem aumentada de TREGs tem relevância prognóstica negativa. Há evidências de que essas células desempenham papel importante no mecanismo de evasão do sistema imune promovido por neoplasias, permitindo que as células tumorais escapem da resposta imune antitumoral do hospedeiro (GHIRINGHELLI et al., 2007; ROUX et al., 2008).

5.5 CD56

Nos carcinomas simples, evidenciou-se que as células imunomarcadas pelo anticorpo CD56 (NK) apresentaram diferença significativa apenas em relação ao CD28 ($p < 0,04$) e Foxp3 ($p < 0,01$). No carcinoma complexo, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), sendo as células imunomarcadas pelo anticorpo CD56 menor que as células imunomarcadas pelo anticorpo CD152 ($p < 0,01$) e CD8 ($p < 0,04$) apenas. Observou-se uma maior quantificação de células imunomarcadas pelo anticorpo CD56 no carcinoma simples em relação ao carcinoma complexo.

As células NK são uma subpopulação de linfócitos que não requerem proliferação para sua atuação. Muitos estudos demonstraram que a atividade de células NK contra células tumorais, está correlacionada com fenômeno de "missing self", ou seja, redução ou ausência de expressão da moléculas de MHC, principalmente o MHC de classe I (ABBAS & LICHTMAN, 2005)

As moléculas de adesão neural (NCAM, CD56) foram as primeiras a serem pesquisada, e desde então, têm sido amplamente estudadas (CROSSIN et al., 2000). Essa molécula é muito utilizada como um marcador neuroendócrino com alta sensibilidade a neoplasias neuroendócrinas sendo utilizada para diagnóstico diferencial de outros tipos de tumores, como encontrado por MCCLUGGAGE et al., (2007) em

neoplasias ovarianas e uterinas em mulheres. O CD56 mostrou ser um marcador sensível para tumores neuroendócrinos, em especial o carcinoma de pequenas células do pulmão e de outros sítios (SUSTER et al., 200). Devemos considerar que o CD56 não é absolutamente específico para diferenciação neuroendócrina, podendo expressar-se em outras situações como carcinoma de células renais e carcinomas serosos do ovário (BARRA, 2006; MCCLUGGAGE et al., 2007).

Vários estudos relataram a possibilidade de que as células NK desempenham papel na resistência do hospedeiro contra o crescimento tumoral e ocorrência de metástases (HANNA et al., 1980; TALMADGE et al., 1980).

CAVALLARO et al., (2001) relatam que a NCAM pode modular a disseminação de células tumorais metastáticas por meio do controle de adesão da matriz celular do tumor e indução da formação de um complexo de sinalização, que ativa várias vias de transdução de sinais, e que juntos resultam em aumento da adesão de matriz celular.

Uma redução no nível de NCAM foi observado por FOGAR et al., (1997), HUERTA et al., (2001) em carcinoma de cólon, pâncreas e astrocitoma, e relatam que uma perda na expressão desse marcador correlaciona-se com um pior prognóstico. Em contraste GLUER et al., (1998), LANTUEJOUL et al., (2000) relataram que em neuroblastoma e certos tumores neuroendócrinos a progressão do tumor correlaciona-se com uma expressão aumentada de NCAM.

PERL et al., (1998) observaram que a progressão de adenoma não invasivo para adenocarcinoma invasivo não tem relação com a diminuição de NCAM no tecido.

A maior quantificação de células imunomarcadas pelo anticorpo CD56 observado no carcinoma simples nos leva a crer que neoplasias com grau histológico menos agressivo, expressam maiores níveis de CD56, tendo menor probabilidade de disseminar células neoplásicas, reduzindo ocorrência de metástases e, que em neoplasias com grau histológico mais agressivo, como os carcinomas complexos, a probabilidade de disseminação de células neoplásicas é muito maior, aumentando ocorrência de metástases, desfavorecendo o prognóstico.

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- O método de imunoistoquímica mostrou-se adequado para a caracterização da resposta imune por meio do infiltrado inflamatório em carcinomas mamários de fêmeas caninas.
- Não havendo diferenças entre a presença de infiltrado inflamatório em amostras fixadas em parafina e amostras congeladas, a possibilidade de erro quanto à quantificação por anticorpos específicos para cada técnica de preservação testada foi nula.
- O padrão de imunomarcção em membrana observado neste experimento, resultante da localização dos CDs (*Cluster of Differentiation*) na membrana dos linfócitos T, concretizam os resultados obtidos.
- A baixa expressão de CD4 em relação ao CD8 nos indica uma falha do sistema imune em reconhecer as células tumorais como antígenos, favorecendo a progressão tumoral.
- A baixa quantificação de linfócitos T CD28 tanto no carcinoma simples quanto no carcinoma complexo, mostra que houve uma falha na ativação do sistema imune.
- A alta expressão do CD152 em ambos os casos nos mostra que em carcinoma mamário de fêmea canina a regulação do sistema imune de forma negativa é alta e que com a progressão tumoral os níveis de CD152 aumentam.
- Embora a baixa expressão do foxp3 encontrada nos carcinomas mamários de fêmeas caninas no presente estudo, seja indicio de melhor resposta do sistema imune, este achado não se correlaciona com os resultados obtidos para os demais marcadores e suas funções.
- A maior expressão de CD56 em carcinomas simples mostra que esse tipo de neoplasia tem menor probabilidade de disseminar células neoplásicas em relação ao carcinoma complexo, resultando em menor ocorrência de metástases.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Editora Ltda. Rio de Janeiro, RJ. 5ed. v.17, p.401-422, 2005.

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

ALLAVENA, P.; PECCATORI, F.; MAGGIONI, D.; ERROI, A.; SIRONI, M.; COLOMBO, N.; LISSONI, A.; GALAZKA, A.; MEIERS, W.; MANGIONI, C.; MANTOVANI, A. Intraperitoneal recombinant γ -interferon in patients with recurrent ascitic ovarian carcinoma: modulation of cytotoxicity and cytokine production in tumor-associated effectors and of major histocompatibility antigen expression on tumor cells. **Cancer Res.** v.50, p.7318-7323, 1990.

ALOYSIOUS, M.M.; ZAITOUN, A.M.; AWAD, S. Mucins and CD56 as markers of tumour invasion and prognosis in periampullary cancer. **British Journal Surgical.** v.96, n.4, p.94, 2010.

ALVES, D.B.; TOZETTI, I.A.; GATTO, F.A.; CASSANDRI, F.; FERREIRA, A.M.T.; FERNANDES, C.E.S.; FALCÃO, G.R.; SCAPULATEMPO, I.D.L.; PADOVANI, C.T.J.; ABDO, M.A.G.S. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.43, n.4, p.425-429, 2010.

AMORIM, F. V.; FERREIRA, A. M. R. Neoplasias Mamária. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária, p.323-337, 2003.

AMORIM, F.V.; FERREIRA, A.M.R. Adenocarcinoma mamário felino. **Prêmio de Pesquisa Waltham**, p.18-28, 2001.

BADAUY, C.M. Estudo dos linfócitos CD20, CD8 e CD4 nas hiperplasia inflamatórias e sua relação com a infecção por *Candida* sp. 2003. 40 f. Tese (Mestrado em Odontologia - Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BAECHER-ALLAN, C.; ANDERSON, D.E. Regulatory cells and human cancer. **Semin Cancer Biol**, v.16, p.98-105, 2006.

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J.A.; FREEMAN, G.J.; HAFLER, D.A. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v.167, n.3, p.1245-53, 2001.

BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D.A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25⁺ T cells discussion. **Clin Immunol**, v.117, n.2, p.192-193, 2005.

BANHAM, A.H.; LYNE, L.; SCASE, T.J.; BLACKLAWS, B.A. Monoclonal antibodies raised to the human FOXP3 protein can be used effectively for detecting Foxp3⁺T cells in other mammalian species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.127, p.376-381, 2009.

BARRA, M.B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS, Porto Alegre**. v.50, n.2, p.173-184, 2006.

BATES, G.J.; FOX, S.B.; HAN, C. Quantification of regulatoryTcells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **J Clin Oncol**. v.24, p.53-73, 2006.

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

BILIK, R.; MOR, C.; HAZAZ, B.; MOROZ, C. Characterization of T-lymphocyte subpopulations infiltrating primary breast cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v.28, p. 143-147, 1989.

BIRD, R.C.; DELNOCENTES, P.; LENZ, S.; THACKER, E.E.; CURIEL, D.T.; SMITH, B.F. An allogeneic hybrid-cell fusion vaccine against canine mammary cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.123, p.289-304, 2008.

BLOOM, S.; SIMMONS, D.; JEWELL, D.P. Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. **Clin Exp Immunol**. v.101, p.157–163, 1995.

BORGES, D.A.; TOZETTI, I.A.; GATTO, F.A. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma de cervice uterina de mulheres infectadas pelo papiloma vírus humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p.425-429, 2010.

BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-69, 1983.

CAI, X.Y.; GAO, Q.; QIU, S.J.; YE, S.L.; WU, Z.Q. et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.132, p.293-301, 2006.

CARRENO, B.M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annu Rev Immunol**. v.20, p.29–53, 2002.

CASTRO, L.M.; PAGLIARI, C.; FERNANDES, E.R.; BRASIL, R.A.; DUARTE, M.S. Immunohistochemical study of the cellular immune response in human. **J Bras Patol Med Lab**, v.42, n.1, p.1-4, 2006.

CAVALLARO, U.; NIEDERMEYER, J.; FUXA, M.; CHRISTOFORI, G. NCAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling. **Nature Cell Biology**. v.3, p.650-657, 2001.

CHAMBERS, C.A.; KUHNS, M.S.; EGEN, J.G.; ALLISON, J.P. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. **Annu Rev Immunol**. v.19, p.565–94, 2001.

CHAMMAS, R.; SONNENBURG, J.L.; WATSON, N.E.; TAI, T.; FARQUHAR, M.G.; VARKI, N.M.; VARKI, A. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. **Cancer Research**, v.59, p.1337-1346, 1999.

CHAMULEAU, M.E.; OSSENKOPPELE, G.J.; VAN DE LOOSDRECHT, A.A. MHC class II molecules in tumour immunology:prognostic marker and target for immune modulation. **Immunobiology**, v.211, p.619-625, 2006.

CHENG, T.Y.; WU, J.T.; LIN, R.H. Induction of tumor-specific T-cell response by cognating tumor cells with foreign antigen-primed Th cells. **Int Immunol**. v.10, p.1397-1406, 1998.

CHIN, Y.; JANSEENS, J.; VANDEPITTE, J.; VANDENBRANDE, J.; OPDEBEEK, L.; RAUS, J. Phenotypic analysis of tumor infiltrating lymphocytes from human breast cancer. **Anticancer Res**, v.12, p.1463-1466, 1992.

CONTARDI, E.; PALMISANO, G.L.; TAZZARI, P.L.; MARTELLI, A.M.; FALA, F.; FABBI, M.; KATO, T.; et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. **Int. J. Cancer**, v.117, p.538-550, 2005.
costimulation. **J Clin Invest**. v.9, p.109-295, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 5ª edição. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996.

CROSSIN, K.L.; KRUSHEL, L.A. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Dev Dyn**. v.218, p. 260-279, 2000.

CURIEL, T.J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat Med**. v. 10, p. 942-949. 2004

DAVIS, I.D. An overview of cancer immunotherapy. **Immunol Cell Biol**. v.78, p.179–95, 2000.

DEL CASTILLO, N. M. Estudio inmunocitoquímico de la expresión de la proteína del gen supresor tumoral p53 y del infiltrado inflamatorio en las neoplasias mamarias caninas. Características clínicas e histopatológicas. Facultad de Veterinaria. Departamento de Patología Animal II. **Universidad Complutense de Madrid**. Madrid. España, 2002.

DELOUIS, C.; RICHARD, P. La lactation. In: Thibault, C.; Levasseur, M.C. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Paris : Marketing, p.487-514, 1991.

DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**. v.4, p.9-10, 2007.

DIETL, J.; HORNY, H.; RUCK, P.; KAISERLING, E. Dysgerminoma of the Ovary An Immunohistochemical Study of Tumor-Infiltrating Lymphoreticular Cells and Tumor Cells. **Cancer**, v.71, n.8, p.2562-2568, 1993.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; VERSTEGEN, J. Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v.138, p.109-117, 1994.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; VERSTEGEN, J.; ECTORS, F. Épidémiologie et hormono-dépendance des tumeurs mammaires de la chienne. **Ann. Méd. Vét.**, n.133, p.491-503, 1989.

DORFMAN, D.M.; SCHULTZE, J.L.; SHAHSAFAEI, A.; MICHALAK, S.; GRIBBEN, J.G.; FREEMAN, G.J.; PINKUS, G.S.; NADLER, L.M. In Vivo Expression of B7-1 and B7-2 By Follicular Lymphoma Cells Can Prevent Induction of T-Cell Anergy But Is Insufficient to Induce Significant T-Cell Proliferation. **Blood**, n.11, v.90, p.4297-4306, 1997.

DUNN, G.P. et al. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v.21, p.137-149, 2004.

EGEN, J.G.; KUHNS, M.S.; ALLISON, J.P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. **Nat. Immunol.** v.3, p.611-618, 2002.

FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, ano 22, n.131, p.64-67, 2003.

FOGAR, P.; BASSO, D.; PASQUALI, C. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) in gastrointestinal neoplasias. **Anticancer Res.** v.17, p.1227-1230, 1997.

FONSECA, C.S.; DALECK, C.R.; Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante, **Ciência Rural**, v.30, n.4, 2000.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**. v.4, n.4, p.330-336, 2003.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol.** v.4, p.330–336, 2003.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Editora Roca, 2002.

FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. Activation and inhibition of lymphocytes by coestimulation. **J Clin Invest.** v.109, n.3, p.295–299, 2002.

FRYDECKA, I.; KOSMACZEWSKA, A.; BOCKO, D.; CISZAK, L.; WOLOWIEC, D.; KULICZKOWSKI, K.; KOCHANOWSKA, I. Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **British Journal of Cancer.** v.90, p.2042–2048, 2004.

FU, S.; ZHANG, N.; YOPP, A.C. TGF-beta induces Foxp3⁺ T-regulatory cells from CD4⁺ CD25⁺ precursors. **Am J Transplant.** v.4, p.1614–1627, 2004.

GAO, Q.; QIU, S.J.; FAN, J.; ZHOU, J.; WANG, X.Y. ET AL. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, p.2586-2593, 2007.

GEORGIANNOS, S.N.; RENAUT, A.; GOODE, A.W.; SHEAFF, M. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. **Surgery**, v.134, p.827-834, 2003.

GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara**, v. 2, 1986.

GHIRINGHELLI, F.; MENARD, C.; PUIG, P.E.L. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. **Cancer Immunol Immunother.** v.56, p.641–648, 2007.

GLUER, S.; SCHELP, C.; MADRY, N. Serum polysialylated neural cell adhesion molecule in childhood neuroblastoma. **Br J Cancer.** v.78, p.106 –110, 1998.

GONZALEZ, C.M. et al. Canine transmissible venereal tumour: a morphological and immunoistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, Endiburg, v.122, p.241-248, 2000.

HANNA, N. Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cyto toxicity. **Int J Cancer.** v.26, p.675-680, 1980.

HARVELL J.D., NOWFAR-RAD M., SUNDRAM U. An immunohistochemical study of CD4, CD8, TIA-1 and CD56 subsets in inflammatory skin disease. **J Cutan Pathol**, v. 30, p. 108–113, 2003.

HATAKA, A.; MARQUES, M.M.; ROCHA, N.S.; ABREU, E.S.; RAHAL, S.C.; PORTO, C.D.; BURINI, C.H.P. Dados epidemiológicos de cadelas portadoras de neoplasias mamárias – resultados parciais. In: 6a Mostra Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP. Botucatu, 2002. **Anais.Botucatu**, 2002.

HEROLD, K.C.; VEZYS, V.; KOONS, A.; LENSCHOW, D.; THOMPSON, C.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 costimulation regulates autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. **J Immunol**, v.158, n.2, p.984-991, 1997.

HORI, S., NOMURA, T., SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v. 299, p. 1057–1061, 2003.

HUERTA, S.; SRIVATSAN, E.S.; VENKATESAN, N. Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. **Surgery (St Louis)**. v.130, p.834–843, 2001.

ICHIHARA, F.; KONO, K.; TAKAHASHI, A.; KAWAIDA, H.; SUGAI, H.; FUJII, H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. **Clin Cancer Res**. v.9, p.4404-4408, 2003.

ITOH, H.; HORIUCHI, Y.; NAGASAKI, T.; SAKONJU, I.; KAKUTA, T.; FUKUSHIMA, U.; UCHIDE, T.; YAMASHITA, M.; KUWABARA, M.; YUSA, S.; TAKASE, K. Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.148, p.1- 61, 2009.

ITOH, M.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, N.; et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J Immunol**, v.162, n.9, p.5317-26, 1999.

JAKÓBISIAK, M.; LASEK, W.; GOLAB, J. Natural mechanisms protecting against cancer. **Immunol. Letters**, v.90, p.103-122, 2003.

JOHNSTON, D.L.; OLSON, J.M.; BENJAMIN, D.R. Gastrointestinal stromal tumor in a patient with previous neuroblastoma. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.23, n.4, p.255-6, 2001.

JOHNSTON, S.D. Oncologia – sistemas reprodutivos. *In*: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, p. 2566- 2583, 1998.

JOHNSTON, S.D. Reproductive systems. In: Slatter D. (Ed). **Textbook of Small Animal Surgery**. 2nd edn. Philadelphia:Saunders, p. 2177-2199, 1993.

JOLING, P.; BROEKHUIZEN, R.; DE WEGER, R.A.; ROTTIER, P.J.M.; EGBERINK, H. Immunohistochemical demonstration of cellular antigens of the cat defined by anti-human antibodies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, n.1, p.115-127, 1996.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. In: **Patologia veterinária**. 6ed. São Paulo: Manole, p.87-118, 2000.

JORDAN, M.S.; BOESTEANU, A.; REED, A.J.; et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist selfpeptide. **Nat Immunol**, v.2, n.4, p.301-6, 2001.

KELER, T.; HALK, E.; VITALE, L.; O'NEILL, T.; BLANSET, D.; LEE, S.; SRINIVASAN, M.; GRAZIANO, R. F.; DAVIS, T.; LONGBERG, N.; KORMAN, A. Activity and Safety of CTLA-4 Blockade Combined with Vaccines in Cynomolgus Macaques. **J Immunol**, v.171, p.6251-6259, 2003.

KERREBIJN, J.D.; BALM, A.J.; FREEMAN, J.L.; DOSCH, H.M.; DREXHAGE, H.A. Who is in control of the immune system in head and neck cancer? **Crit Rev Oncol Hematol**, v.31, n.1, p.31-53. 1999.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev. Oncol. Hematol**, v.44, p.143–161, 2002.

KUMMEL, M.F.; ALLISON, J.P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. **J Exp Med**. v.183, p.2533–2540, 1996.

LANTUEJOUL, S.; LAVERRIERE M.H.; STURM, N. NCAM (neural cell adhesion molecules) expression in malignant mesotheliomas. **Hum Pathol.** v.31, p.415–21, 2000

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Ann Rev Immunol.** v.14, p.233–258, 1996.

LINSLEY, P.S.; BRADSHAW, J.; URNES, M.; GROSMARE, L.; LEDBETTER, J.A. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. **J Immunol**, v.150, p.3161–3169, 1993.

LIU, C.; YU, S.; ZINN, K.; WANG, J.; ZHANG, L.; JIA, Y.; KAPPES, J.C.; BARNES, S.; KIMBERLY, R.P.; GRIZZLE, W.E.; ZHANG, H.G. Murine Mammary Carcinoma Exosomes Promote Tumor Growth by Suppression of NK Cell Function. **The Journal of Immunology**, v.176, p.1375-1385, 2006.

LUNA, L. G. Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology, 3 ed. **New York: McGraw-Hill.** p. 258., 1968.

MACEWEN, E.G. Current concepts in cancer therapy: biologic therapy and chemotherapy. **Semin. Vet. Med. Surg (small Animal)**, v.1, p.5-16, 1986.

MADEWELL, B.R.; THEILEN, G.H. Tumors of the mammary gland. **In Veterinary Cancer Medicine Lea & Febiger.** p.327-341, 1987.

MAGGI, E.; COSMI L.; LIOTTA F.; et al. Thymic regulatory T cells. **Autoimmun Rev**, v.4, n.8, p.579-86, 2005.

MAO, H.; ZHANG, L.; YANG, Y.; ZUO, W.; BI, Y.; GAO, W.; DENG, B.; SUN, J.; SHAO, Q.; QU, X. New Insights of CTLA-4 into Its Biological Function in Breast Cancer **Current. Cancer Drug Targets**. v.10, p.728-736, 2010.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p. 38-42, 2002.

MCCLUGGAGE, W.G.; MCKENNA, M.; MCBRIDE, H.A. CD56 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of ovarian sex cord-stromal tumors. **Int J Gynecol Pathol**. v.26, n.3, p.322-327, 2007.

MELICHAR, B.; NASH, M. A.; LENZI, R.; PLATSOUKAS, C.D.; FREEDMAN, R.S. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3⁺ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. **Clinical & Experimental Immunology**. v.119, p.19–27, 2000.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State : Univ. California, 788p., 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **World Health Organization**. Washington, D.C., v.7, p.59, 1999.

MOHAMADZADEH, M.; BERARD, F.; ESSERT, G.; CHALOUNI, C.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Interleukin IL- 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. **J Exp Med**, v.194, p.1013-1020, 2001.

MOL, J.A.; VAN GARDEREN, E.; RUTTEMAN, R.G. New Insights in the molecular mechanism of progestin - induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormones (GH) in the mammary gland of dogs, cats, humans. *J. Steroids Biochem. Mol. Biol*, v.57, p.67-71, 1996.

MORRISON. W. B. Canine and feline mammary tumors. In: ***Cancer in Dogs and Cats***. Baltimore: Williams & Wilkins, p.591-598, 1998.

MOTA, E.F.F.; OLIVEIRA, S.R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n.30, p.29-47, 1999.

MOTTOLLESE, M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCJARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, G.N. – A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2 p.182-187, 1994.

MOULTON, J.E.; TAYLOR, D.O.N.; DORN, C.R.; ANDERSEN, A.C. Canine mammary tumors. **Pathology Veterinary**, v.7, n.4, p.289-320, 1970.

MULDOON, T.G. Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. **Endocrinol**, v.109, n.5, p.1339-1346, 1981.

NAKAZAWA A.; WATANABE M.; KANAI T.; YAJIMA T.; YAMAZAKI M.; OGATA H.; ISHII H.; AZUMA M. HIBI T. Functional Expression of Costimulatory Molecule CD86 on

Epithelial Cells in the Inflamed Colonic Mucosa. **Gastroenterology**, v.117, p.536–545, 1999.

NELSON, D.J.; MUKHERJEE, S.; BUNDELL, C.; FISHER, S.; VANHAGEN, D.; ROBINSON, B. Tumor progression despite efficient tumor antigen cross-presentation and effective “arming” of tumor antigen-specific CTL. **J Immunol.** v.166, p.5557-5566, 2001.

NIETO, A.; PENA, L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SANCHEZ, M. A.; FLORES, J. M.; CASTANO, M. Immunohistochemical detection of estrógeno receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Veterinary Pathology**, v.37, p.239-247, 2000.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Hormones. 2.ed. San Diego : Academic, 558p, 1997.

NOWAK M.; MADEJ J.P.; ROSSOWSKA J.; MADEJ J.A. Involvement of cd8+ cells in protective mechanisms in canine mammary adenocarcinomas (short communication). **Bull Vet Inst Pulawy**, v.51, p.445-448, 2007.

O’NEILL K.; GUTH A.; BILLER B.; ELMSLIE R.; DOW S. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. **J Vet Intern Med**, v.23, p.875–881, 2009.

O’NEILL, K.; GUTH, A.; BILLER, B.; ELMSLIE, R.; DOW, S. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. **J Vet Intern Med.** v.23, p.875–881, 2009.

OCHSENBEIN, A.F.; KLENERMAN, P.; KARRER, U. Immune surveillance a solid tumor fails because of immunological ignorance. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.96, p.2233-2238, 1999.

ORMANDY, L.A.; HILLEMANN, T.; WEDEMEYER, H.; MANNS, M.P.; GRETEN, T.F.; KORANGY, F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. **Cancer Res.** v.65, p.2457-2464, 2005.

PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.89, p.10-29, 1994.

PELLAT-DECEUNYNCK C.; BATAILLE R.; ROBILLARD N.; HAROUSSEAU J.L.; RAPP M.J.; JUGE- MORINEAU N.; WIJDENES J.; AMIOT M. Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells semimonthly. **Blood**, v. 84, n. 8, p. 2597-2603, 1994.

PEREZ J.; DAY M.J.; MOZOS E. Immunohistochemical study of the local inflammatory infiltrate in spontaneous canine transmissible venereal tumour at different stages of growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v.64, p.133-147, 1998.

PEREZ J.; MOZOS E.; MARTIN M.P.; DAY M.J. Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Equine Squamous Cell Carcinoma. **J. Comp. Path.**, v.121, p.385–397, 1999.

PERL, A.K.; WILGENBUS, P.; DAHL, U.; SEMB, H. CHRISTOFORI, G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature.** v.392, p.190–193, 1998.

PIEKARZ, C.H.; BIONDO, A.W., BARROS, F.I.R.; RODASKI, S. Imunologia tumoral como ferramenta na oncologia veterinária. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, Umuarama**, v.9, n.2, p.141-145, 2006.

PRALL, F.; DÜHRKOP, T.; WEIRICH, V.; OSTWALD, C.; LENZ, P.; NIZZE, H.; BARTEN, M. Prognostic role of CD8+ infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. **Hum. Pathol**, v.35, p.808-816, 2004

PROSS, H. F.; LOTZOVA, E. Role of natural killer cells in cancer. **Nat.Immun**, v.12, p.279–292, 1993.

RAHAL, S.C. Uso da fluoresceína na identificação de vasos linfáticos superficiais das glândulas mamárias das cadelas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 2, p. 251-254, 1995.

REUBEN, J. M.; LEE, B.N.; LI, C.; GOMEZ-NAVARRO, J.; BOZON, V.A.; PARKER, C.A.; HERNANDEZ, I.M.; GUTIERREZ, C.; LOPEZ- BERESTEIN, G.; CAMACHO, L. H. Biologic and immunomodulatory events after CTLA-4 blockade with ticilimumab in patients with advanced malignant melanoma. **Cancer**. v.106, p.2437-2444, 2006.

ROUX, S.; APETOH, L.; CHALMIN F.; LADOIRE S.; MIGNOT, G.; PUIG, P.E.; LAUVAU, G.; ZITVOGEL, L.; MARTIN, F.; CHAUFFERT, B.; YAGITA, H.; SOLARY, E.; GHIRINGHELLI, F. CD4+CD25+ TREGS control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. v.118, n.11, p.3751–3761, 2008.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. W.B. **Small Animal Clinical Oncology**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 455-477, 2001.

RUTTEMAN, GR. Hormones and mamary tumor disease in the female dog: un update. **In Vivo**, v. 4, n. 4, p. 33-40, 1990.

RUTTEN, V.P.; MISDORP, W.; GAUTHIER, A.; ESTRADA, M.; MIALOT, J.P.; PARODI, A.L.; RUTTEMAN, G.R.; WEYER, K. Immunological aspects of mammary tumors in dogs and cats: a survey including own studies and pertinent literature. **Veterinary Immunopathology**. v. 26, n.3, p.211-25, 1990.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 531-62, 2004.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, T. Foxp3 CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev.** v.212, P. 8–27, 2006.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1151-64, 1995.

SANDERSON, I.R.; OUELLETTE, A.J.; CARTER, E.A.; WALKER, W.A.; HARMATZ, P.R. Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. **Immunology**, v.79, p.434-438, 1993.

SATO, E.; OLSON, S.H.; AHN, J. Intraepithelial CD81 tumorinfiltrating lymphocytes and a high CD81/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.102, p.18538–18543, 2005.

SAUTET, J.Y. et al. Lymphatic system of the mammary glands in the dog: an approach to the surgical treatment of malignant mammary tumors. **Canine Practice**, v.17, n.2, p.30-33, 1992.

SCHÖNDORF, T.; ENGEL, H.; LINDEMANN, C.; KOLHAGEN, H.; VON RÜCKER, A.; MALLMAN, P. Cellular characteristics of peripheral blood lymphocytes and tumour infiltrating lymphocytes in patients with gynaecological tumours. **Cancer Immunol Immunother.** v.44, p.88-96, 1997.

SHEU, B. C.; KUO, W. H.; CHEN, R. J.; HUANG, S. C.; CHANG, K. J.; CHOW, S. N. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. **Breast**, v.6, p.604-610, 2008.

SILVEIRA, T.A.C.; GERARDI, D.; MOUROII, J. V.; COSTA, M. T.; ALESSI, A. C. Immunohistochemical expression of B and T-lymphocytes and TGF- β in experimentally transplanted canine venereal tumor. **Ciência Rural**, v.39, n.4, p. 1148-1154, 2009.

SLATTER, D. et al. **Manual de cirurgia de pequenos animais**, v.2, ed. São Paulo: Ed. Manole, 1998.

SMALL, E.J.; TCHEKMEDYIAN, N.S.; RINI, B.I.; FONG, L.; LOWY, I.; ALLISON, J.P. A pilot trial of CTLA-4 blockade with human anti- CTLA-4 in patients with hormone-refractory prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.13, p.1810-1815, 2007.

SMYTH, M.J.; GODFREY, D.I.; TRAPANI, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. **Nat. Immunol.** v.2, p.293-299, 2001.

SORENMO, K. An update on canine mammary glandtumors. **Proceedings of the16th Acvim Forum**, p.387-8, 1998.

SORRIBAS, C.E. Glândula Mamária. In: SORRIBAS, C.R. **Reproduccion en los animales pequeños**. Buenos Aires: Inter Médica, p. 91-102, 1995.

SPIOTTO, M.T. Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. **Current opinion in immunology**, v.15, p.725-730, 2003.

STAGG, J.; JOHNSTONE, R.W.; SMYTH, M.J. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. **Immunol Rev**, v.220, p.82–101, 2007.

SUEIRO, F.A.R.; ALESSI, A.C.; VASALLO, J. Canine Lymphomas: a Morphological and Immunohistochemical Study of 55 Cases, with Observations on p53 Immunoexpression. **J. Comp. Path**, v.131, p.207–213, 2004.

SUGAMURA, K.; ASAO, H.; KONDO, M.; TANAKA, N.; ISHII, N.; NAKAMURA, M.; TAKESHITA, T. The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. **Adv Immunol**, v. 59, p. 225-277, 1995.

SUSTER, S.; MORAN, C.A.; WICK. Immunohistochemistry in Tumor Diagnosis. **Seminars in Diagnóstico Pathology**. v.17, n.3, p.169-256, 2000.

TALMADGE, J.E.; MEYERS, K.M.; PRIEUR, D.J.; STARKEY, J.R. Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. **Nature**. p.284-622, 1980.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. Ed. Roca Ltda. São Paulo, SP, v. 25, p. 330-342. 6ed. 2002.

TOLOSA, E.M.C.; BEHMER, O.A.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Barueri – SP: Manole, p. 331, 2003.

TROMPIERI, S. A.C. Caracterização do infiltrado inflamatório e avaliação dos marcadores de prognóstico ki-67, p53, receptor de estrógeno e progesterona no tumor mamário maligno de cadelas. **Tese doutorado apresentada em julho de 2009**.

TROMPIERI-SILVEIRA, A.C.; GERARDI, D.; MOURO, J.V.; COSTA, M.T. Expressão imunoistoquímica de linfócitos T e B e do TGF- β no tumor venéreo transmissível canino experimentalmente transplantado. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p.1148-1154, 2009.

ULICH, T.R.; DEL CASTILL,O J.; WATSON, L.R. In vivo hematologic effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor. **Blood**. v.75, p.846, 1990.

VAHLENKAMP, T.W.; TOMPKINS, M.B.; TOMPKINS, W.A. Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells. **J Immunol.** v.172, p.4752–4761, 2004.

VANHERBERGHEN, M.; DAY, M.J.; DELVAUX, F.; GABRIEL, A.; CLERCX, C.; PEETER, D. An Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Nasal Carcinoma in Dogs and Cats. **J. Comp. Path.** v.141, p.17-26, 2009.

VAQUERO, J.; COCA, S.; MAGALLÓN, R.; PONTÓN, P.; MARTINEZ, R. Immunohistochemical study of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphocytes of primary intracranial germinomas. **J Neurosurg.** v. 72, n. 4, 1990.

VAQUERO, J.; COCA, S.; OYA, S. Presence and significance of NK cells in glioblastomas. **J Neurosurg.** v. 70, p.728–731, 1989.

WHITESIDE, T.L.; PARMIANI, G. Tumor infiltrating lymphocytes: their phenotype, functions and clinical use. **Cancer Immunol Immunother.** v.39, p.15-21, 1994.

WILLETT, W.C. Diet and cancer. **Oncologist**, v. 5, n. 5, p. 393-404, 2000.

WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology.** 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 4-16, 1996.

WOO, E.Y.; CHU, C.S.; GOLETZ, T.J. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **Cancer Res.** v.61, p.4766-4772, 2001.

YAMAGIWA, S.; GRAY, J.D.; HASHIMOTO, S.; HORWITZ, D.A. A role for TGFbeta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. **J Immunol.** v.166, p.7282– 7289, 2001.

ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA, J.R.; KATSAROS, D.; GIMOTTY P.A.; MASSOBRIO M.; REGNANI G.; MAKRIGIANNAKIS A.; GRAY H.; SCHLIENGER K.; LIEBMAN M.N.; RUBIN S.C.; COUKOS G. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. **N Engl J Med**, v.348, p.203-13, 2003.

ZHENG, S.G.; GRAY, J.D.; OHTSUKA, K.; YAMAGIWA, S.; HORWITZ, D.A. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. **J Immunol**. v.169, p.4183–4189, 2002.

ZOUAIN, C.S.; FALCÃO, P.L.; GOES, T.S.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans. **Immunology Letters**, v.91, p.113–118, 2004.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. **Arq Bras Med Vet e Zootecnia**, v.54, n.6, 2002.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas. **Clínica Veterinária**, n.2, p.50-54, 2001.