

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E  
AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE PROGNÓSTICO Ki-67,  
p53, RECEPTOR DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO  
TUMOR MAMÁRIO MALIGNO DE CADELAS.**

Ana Carolina Trompieri Silveira  
Médica Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Julho 2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E  
AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DE PROGNÓSTICO Ki-67,  
p53, RECEPTOR DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA NO  
TUMOR MAMÁRIO MALIGNO DE CADELAS.**

Ana Carolina Trompieri Silveira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

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

**Jaboticabal – São Paulo – Brasil  
Julho 2009**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ANA CAROLINA TROMPIERI SILVEIRA** – nascida na cidade de Uberaba – MG, em 09 de julho de 1979. É Médica Veterinária formada em Dezembro de 2002 pela Universidade Estadual Paulista (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP) – Campus de Jaboticabal, SP. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, sob orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Em 05 de julho de 2005 recebeu o título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal) pela comissão examinadora assim constituída, Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa (orientadora), Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado e Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari, junto a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Campus de Jaboticabal – SP. Em março de 2006 iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária, na mesma instituição de ensino, sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi. Entre os meses de setembro e dezembro de 2008 realizou um estágio de aperfeiçoamento em Patologia Especial, na Universidade Complutense de Madri, Espanha, sob a supervisão da Profa. Dra. Laura Peña.

### **Pra ser grande, sê inteiro**

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a Lua toda  
Brilha, porque alta vive.

*Ricardo Reis (Fernando Pessoa)*

## **DEDICO,**

Em primeiro lugar, a Deus, criador de todas as coisas. Que me deu o dom da vida! Obrigada, Pai, Amigo, Senhor! A Ti não preciso dizer nada, Tu sabes tudo.

Aos meus pais Edna e Dorpides, por todo amor, carinho e entrega aos meus sonhos e vontades.

Ao meu irmão Giulliano, minha cunhada Deliani e a minha mais nova sobrinha Maria Clara, por todo carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu noivo Daniel, por todo amor, companheirismo e partilha.

**Amo muito vocês!!**

## **AGRADEÇO,**

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi, pela amizade, paciência, confiança e dedicação ao aceitar esta orientação.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, por acreditar em mim e auxiliar a continuação da minha vida acadêmica.

À Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pela amizade e toda a dedicação dispensada.

Aos amigos, Marcos André, Márcia Jusi, amizade, carinho, auxílio e brincadeiras. Vou sentir saudade de vocês e de nossas risadas.

À amiga, mana científica e confidente Geórgia Modé Guimarães, obrigada por todo carinho, apoio, auxílio e dedicação.

Às novas amigadas, Maria do Socorro (Help), Carla, Márcia Teixeira, Tamires, por todas as brincadeiras, partilhas, conversas e comemorações...

À Maria Inês Y. Campos (Lia), por todo carinho, cuidado. Toda dedicação na confecção das lâminas. Obrigada pelos cafés da manhã, lanches da tarde...

Aos funcionários do Departamento de Patologia, Moema Ogassawara, João Domingos, Edgard Homem, Narciso B. Tel, Francisca A. Ardisson e Ronaldo Del Vecchio.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de auxílio a pesquisa e bolsa de doutorado (proc. 06/00249-5).

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	iii
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	v
<b>RESUMO .....</b>	ix
<b>ABSTRACT .....</b>	x
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>II. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	3
II.1 Neoplasia mamária.....	3
II.2 Fatores prognósticos.....	5
II.2.1 Receptores de estrógeno e progesterona.....	5
II.2.2 Índice de Proliferação Celular (Ki-67).....	6
II.2.3 Gene p53.....	7
II.3 Infiltrado inflamatório e imunidade tumoral.....	9
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	16
III.1 Grupos Experimentais.....	16
III.2 Anticorpos.....	18
III.3 Imuno-histoquímica.....	19
III.4 Padronização da técnica de imuno-histoquímica.....	19
III.5 Contagem das células marcadas .....	22
III.6 Análise Estatística .....	22
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	22
IV.1 Padrão de Imunorreatividade.....	23
IV.1.1 Padrão de Imunorreatividade para o Receptor de Estrógeno.....	24
IV.1.2 Padrão de Imunorreatividade para o Receptor de Progesterona.....	26
IV.1.3 Padrão de Imunorreatividade para o Ki-67.....	28
IV.1.4 Padrão de Imunorreatividade para a p-53.....	30
IV.1.5 Padrão de Imunorreatividade para o MHC II.....	32

IV.1.6 Padrão de Imunorreatividade para IL-2R.....	34
IV.1.7 Padrão de Imunorreatividade para TGF- $\beta$ .....	36
IV.1.8 Padrão de Imunorreatividade para CD79- $\alpha$ .....	38
IV.1.9 Padrão de Imunorreatividade para CD3.....	41
IV.1.10 Padrão de Imunorreatividade para CD4.....	43
IV.1.11 Padrão de Imunorreatividade para CD8.....	46
IV.1.12 Padrão de Imunorreatividade para CD68.....	49
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>VI. CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>VII. REFERÊNCIAS</b> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	AVIDINA BIOTINA PEROXIDASE
<b>APC</b>	CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO
<b>CD</b>	CÉLULAS DENDRÍTICAS
<b>CD3</b>	LINFÓCITOS PAN T
<b>CD4</b>	LINFÓCITOS T HELPER
<b>CD8</b>	LINFÓCITOS T CITOTÓXICO
<b>CD-68</b>	MACRÓFAGOS
<b>CD79-<math>\alpha</math></b>	LINFÓCITOS B
<b>CSS</b>	CARCINOSSARCOMA
<b>CS</b>	CARCINOMA SÓLIDO
<b>CTP</b>	CARCINOMA TUBULOPAPILAR
<b>ER</b>	RECEPTOR DE ESTRÓGENO
<b>GM-CSF</b>	FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DA SÉRIE GRANULOCÍTICA MACROFÁGICA
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	INTERFERON $\gamma$
<b>IL-2r</b>	RECEPTOR DA INTERLEUCINA 2
<b>Ki-67</b>	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR
<b>MHC</b>	COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL
<b>M-CSF</b>	FATOR ESTIMULANTE DE COLÔNIA DE MACRÓFAGOS
<b>NK</b>	CÉLULAS NATURAL KILLER
<b>PBS</b>	TAMPÃO FOSFATO
<b>PR</b>	RECEPTOR DE PROGESTERONA
<b>p53</b>	GENE SUPRESSOR DE TUMOR
<b>RCT</b>	RECEPTOR DE CÉLULAS T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	FATOR TRANSFORMANTE DO CRESCIMENTO
<b>TILs</b>	LINFÓCITOS INFILTRADOS NO TUMOR

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1-</b> Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas de tumores mamários caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones e procedências.....	18
<b>Tabela 2 -</b> Tipo de recuperação antigênica, tempo e diluição utilizada para cada anticorpo primário.....	21
<b>Tabela 3 -</b> Médias percentuais e desvio-padrão das contagens das células imunomarcadas pelos respectivos anticorpos em cada tipo de tumor.....	23

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Fotomicrografia de preparação histológica (hematoxilina-eosina) em glândula mamária de cadela. A, glândula mamária normal. B, Carcinoma Tubulopapilar. C, Carcinoma sólido. D, Carcinossarcoma .....	16
<b>Figura 2</b> Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica em carcinossarcoma, anticorpo anti-ER. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	25
<b>Figura 3</b> Imunomarcção do ER nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) .....	26
<b>Figura 4</b> Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti-PR. Notar marcação citoplasmática nas células epiteliais glandulares. (Método Estreptoavidina Biotina; Barra = 100um) .....	27
<b>Figura 5</b> Imunomarcção do PR nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) .....	28
<b>Figura 6</b> Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no Carcinoma Sólido, anticorpo anti- Ki-67. Notar coloração mais intensa das células em divisão. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	29
<b>Figura 7</b> Imunomarcção da proteína nuclear Ki-67 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).....	30

<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinossarcoma, anticorpo anti-p-53. Notar marcação em células epiteliais neoplásicas e também mioepiteliais. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).....	31
<b>Figura 9</b>	Imunomarcção da proteína p-53 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).....	32
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinossarcoma, anticorpo anti- MHC-II. Notar marcação do citoplasma de células epiteliais neoplásicas. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).....	33
<b>Figura 11</b>	Imunomarcção da molécula MHC-II nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).....	34
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica do carcinossarcoma, anticorpo anti- IL-2r. Em A, algumas células epiteliais neoplásicas intensamente coradas. Em B, marcação intensa em citoplasma de fibroblastos (seta). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 50um).....	35
<b>Figura 13</b>	Imunomarcção da IL-2r nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ).....	35
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinossarcoma, anticorpo anti-TGF- $\beta$ . Notar a marcação de linfócitos no tecido conjuntivo (seta). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).....	37
<b>Figura 15</b>	Imunomarcção do TGF- $\beta$ nas neoplasias mamárias de cadela. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).....	38

<b>Figura 16</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti CD79- $\alpha$ , notar marcação de linfócitos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Peroxidase; Barra = 100um) .....	39
<b>Figura 17</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma tubulopapilar, anticorpo anti CD79- $\alpha$ . Notar marcação em plasmócitos. (Método Estreptoavidina Peroxidase; Barra = 100um) .....	40
<b>Figura 18</b>	Imunomarcção do CD79- $\alpha$ nas neoplasias mamárias de cadela. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) .....	41
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti-CD-3. Notar a marcação citoplasmática dos linfócitos T no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	42
<b>Figura 20</b>	Imunomarcção do CD3 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ) .....	43
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em Carcinoma Sólido, anticorpo anti- CD-4. Notar a presença de linfócitos T helper no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	44
<b>Figura 22</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em Carcinoma Sólido, anticorpo anti-CD-4. Notar a marcação citoplasmática os linfócitos T. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	45
<b>Figura 23</b>	Imunomarcção do CD4 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ) .....	46

<b>Figura 24</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinosarcoma, anticorpo anti-CD8. Notar a marcação de linfócito T citotóxicos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	47
<b>Figura 25</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinoma sólido, anticorpo anti-CD8. Notar os linfócitos T citotóxicos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	48
<b>Figura 26</b>	Imunomarcção do CD8 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais, não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ) .....	49
<b>Figura 27</b>	Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma tubulopapilar anticorpo anti-CD-68. Macrófagos fracamente marcados localizados no foco inflamatório entre as glândulas mamárias. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um) .....	50
<b>Figura 28</b>	Imunomarcção do CD68 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ).....	51

## **Caracterização do infiltrado inflamatório e avaliação dos marcadores de prognóstico Ki-67, p53, receptor de estrogênio e progesterona no tumor mamário maligno de cadelas**

**RESUMO:** Tendo em vista a elevada incidência das neoplasias mamárias nas cadelas, este trabalho teve como objetivo avaliar as células inflamatórias infiltradas e também a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tumores malignos bem como investigar os marcadores de prognóstico nas mesmas neoplasias. Para a realização deste estudo foram selecionadas 30 amostras de tumores mamários de cadelas. As amostras foram divididas em 3 grupos, de acordo com a classificação histopatológica sendo, carcinossarcoma, carcinoma sólido, carcinoma tubulopapilar. A avaliação das células inflamatórias CD3 (Dako), CD4 (Novocastra), CD8 (Novocastra), CD79- $\alpha$  (Dako), CD68 (Dako), citocinas TGF- $\beta$  (Santa Cruz), IL-2r (Santa Cruz) e dos marcadores de prognóstico Ki-67, p53, ER e PR, foi conduzida por imuno-histoquímica, utilizando-se a técnica estreptoavidina-biotina-peroxidase. Em relação aos resultados obtidos, observou-se maior concentração de linócitos B nos carcinomas sólidos e tubulopapilares, o que também foi visto para a citocina TGF- $\beta$  podendo-se sugerir que essa citocina esteja auxiliando a resposta imune humoral do hospedeiro favorecendo assim o tumor. Esses dois marcadores apresentaram diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade do carcinossarcoma e os outros dois tumores. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos três tipos de tumores para o marcador ER. Para o PR, a diferença significativa foi vista entre o carcinoma sólido e carcinoma tubulopapilar, o mesmo sendo visto para o Ki-67. O gene p53 apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade do carcinossarcoma e do carcinoma sólido e tubulopapilar, o mesmo acontecendo para o MHC II. Não houve correlação entre a resposta inflamatória e os marcadores de prognóstico. Houve correlação negativa entre o p53 e os receptores de progesterona e estrogênio.

**Palavras-chave:** Tumor de mama, cadela, marcadores, infiltrado inflamatório, prognóstico

## **Characterization of the inflammatory infiltrate and evaluation of the Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors prognostic markers in malignant mammary tumors in dogs**

**ABSTRACT:** In view of the high incidence of mammary neoplasia in dogs, the aim of this study was to evaluate the inflammatory infiltrate cells and presence of pro and anti-inflammatory cytokines in malignant tumors, and to investigate the prognostic markers in these neoplasms. For this, a sample of 30 mammary tumors from dogs was selected. The samples were divided into three groups according to histopathological classification: carcinosarcoma, solid carcinoma or tubulopapillary carcinoma. The CD3 (Dako), CD4 (Novocastra), CD8 (Novocastra), CD79- $\alpha$  (Dako) and CD68 (Dako) inflammatory cells, TGF- $\beta$  (Santa Cruz) and IL-2r (Santa Cruz) cytokines and Ki-67, p53, estrogen receptor and progesterone receptor prognostic markers were evaluated by means of immunohistochemistry, using the streptavidin-biotin-peroxidase technique. It was found that the B lymphocyte concentration was greater in solid and tubulopapillary carcinomas. This was also seen for TGF- $\beta$  cytokines, which may suggest that this cytokine was helping the host's humoral immune response, thereby favoring the tumor. The immunoreactivity of these two markers was significantly different ( $P < 0.05$ ) between carcinosarcomas and the other two tumor types. There were significant differences ( $P < 0.05$ ) in immunoreactivity between the three tumor types for the estrogen receptor marker. For progesterone receptors and Ki-67, a significant difference was seen between solid and tubulopapillary carcinomas. For the gene p53 and MHC II, there was a significant difference ( $P < 0.05$ ) in immunoreactivity between carcinosarcomas and the other two tumor types. There was no correlation between the inflammatory response and the prognostic markers. There was a negative correlation between p53 and the progesterone and estrogen receptors.

**Key words:** mammary tumors, dogs, markers, inflammatory infiltrate, prognostic.

## I. INTRODUÇÃO

Estudos sobre tumores espontâneos de animais domésticos estão sendo considerados como promissores para o esclarecimento de importantes questões da oncologia, com provável repercussão no estudo das neoplasias de seres humanos.

Na década de 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou interesse em incentivar estudos nessa área, organizando conferências, estabelecendo centros de referência em oncologia comparada e, especialmente, incentivando patologistas veterinários a desenvolverem uma classificação histológica para as neoplasias espontâneas em animais, as quais, possivelmente, são correspondentes à classificação da OMS para as neoplasias humanas.

A aplicabilidade desse modelo de estudo deve-se em princípio, à alta incidência de neoplasias mamárias em cadelas e também à semelhança do comportamento biológico das mesmas, quando comparadas às espécies canina e humana. Além disso, a interação tumor-hospedeiro pode ter um papel importante na determinação da resposta imune contra o tumor. Em experimentos em tumores no homem sugere-se que as interações entre as células do tumor e as do hospedeiro podem ter efeitos estimulatórios e inibitórios na imunidade antitumor, em decorrência da composição celular heterogênea das células infiltradas e das suas diferentes interações com as células do tumor, com significância prognóstica variável.

Embora o infiltrado linfocitário seja considerado uma manifestação da resposta imune contra o tumor, o papel central das células T na imunidade antitumoral ainda é controverso. A presença dos linfócitos infiltrados no tumor (TILs) tem sido correlacionada com o tamanho, estágio do tumor e a sobrevida do paciente em uma variedade de neoplasias, incluindo as de cólon e reto, as de próstata e os carcinomas de estômago. Correlação inversa foi descrita em outros tipos de tumores, como no carcinoma esofágico e no carcinoma renal, em que a presença de células T foi relacionada com uma baixa sobrevida dos pacientes.

Nos últimos anos, muito esforço tem sido feito para encontrar correlações entre estágio clínico, diferenças no critério histomorfológico e prognóstico clínico. Informações

sobre o prognóstico podem ser obtidas pelo grau histológico, avaliação da proliferação celular (Ki-67) expressão de receptores hormonais e expressão aberrante da proteína supressora de tumor p53 .

Apesar da intensa investigação clínico-patológica, muito pouco se sabe sobre prognóstico e causas do tumor mamário. Então, prognósticos acurados e adicionais são requeridos para ajudar na identificação de pacientes de alto risco. Recentes avanços na biologia do tumor têm identificado inúmeros marcadores que podem ser a base para desmistificação do tumor.

Portanto, os objetivos deste estudo são: caracterizar fenotipicamente a presença do infiltrado celular inflamatório no tumor mamário; avaliar a ação de citocinas como IL-2 e TGF- $\beta$  no ambiente tumoral e avaliar alguns indicadores de prognóstico como os marcadores Ki-67, p53, receptores de estrógeno e progesterona.

## **II. REVISÃO DE LITERATURA**

### **II.1 Neoplasia mamária**

Os tumores mamários são as neoplasias mais frequentes na fêmea canina e também na mulher (MOULTON, 1990; COTRAN et al., 2000). De todos os tumores que afetam a cadela, aproximadamente 50% são de mama (ANDERSON, 1965; FIDLER & BRODEY, 1967; SCHNEIDER et al., 1969). Esta porcentagem diminui marcadamente em animais ovariectomizados antes do primeiro cio (DORN et al., 1968), reduzindo-se a probabilidade de desenvolvimento das neoplasias mamárias a 0,05% (SCHNEIDER et al., 1969; TAYLOR et al., 1976) e de 8 – 26% se a cirurgia de castração é feita após o primeiro ou segundo cio respectivamente (SCHNEIDER et al., 1969).

Aproximadamente metade dos tumores mamários caninos é maligna, entre 41 e 53% (BRODEY et al., 1983; MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001), constituindo uma das principais causas de morte na cadela. Junto com o próprio interesse veterinário, a investigação dos tumores mamários caninos é relevante no âmbito da oncologia comparada, sendo útil como modelo animal ao tratar-se de neoplasias espontâneas que apresentam certas semelhanças com o câncer de mama da mulher, tanto no que se refere à etiologia quanto à patologia (DORN et al., 1968; MISDORP, 1976; BOSTOCK, 1975).

Geralmente, os tumores mamários apresentam-se como nódulos circunscritos, de dimensões variáveis. Em relação à mobilidade, podem ser móveis ou aderidos, com extenso envolvimento cutâneo e muscular. Ao corte, podem ter aspecto sólido, cístico ou misto, em cuja superfície são observados freqüentemente focos de necrose (BRODEY et al., 1983; RUTTEMAN et al., 2001).

Não existe uma classificação histológica aceita de forma unânime para os tumores mamários caninos (GILBERTSON et al., 1983). O valor das classificações se baseia em sua capacidade de prever o comportamento biológico da neoplasia (BOSTOCK, 1986), pois existem muitas classificações morfológicas propostas (COTCHIN, 1958; FOWLER et al., 1974, HAMPE & MISDORP 1974; MONLUX et al., 1977; MOULTON, 1990). Esta variedade de nomenclatura histológica torna difícil a

comparação de estudos sobre o comportamento biológico das neoplasias malignas, principalmente aquelas de origem epitelial (BENJAMIN et al., 1999).

MISDORP et al. (1999) apresentaram uma nova revisão da classificação da OMS para as neoplasias mamárias caninas. Nesta nova classificação desaparecem os termos adenocarcinoma e tumor misto maligno, passando a englobar os adenocarcinomas dentro do termo carcinoma, e dentro deste incluir-se-ia o subtipo “carcinoma tubulopapilar”. No caso dos tumores mistos malignos essa terminologia desaparece e é substituída pelo termo “carcinossarcoma”.

O exame histopatológico é o método de eleição para identificar as características de uma neoplasia (LIMA & MARTINS, 1992; MOTA & OLIVEIRA, 1999). É considerado o método mais confiável no diagnóstico de tumor de mama canino, já que permite a avaliação de fatores como infiltração vascular, cutânea e de tecidos moles. Além disso, oferece dados como grau de diferenciação, índice mitótico, presença de necrose (MISDORP et al., 1999).

Tumores mamários caninos são muito heterogêneos no que se refere aos seus aspectos clínicos e patológicos. A demonstração de parâmetros clínicos e patológicos com significado prognóstico e/ou terapêutico nestas neoplasias é um valioso campo de estudo na Medicina Veterinária e têm sido mundialmente revisados (BOSTOCK, 1975; MISDORP, 1976; BOSTOCK, 1986; KURZMAN & GILBERTSON et al., 1986; BENJAMIN, 1999).

Apesar de intensa investigação clínico-patológica, muito pouco se sabe sobre prognóstico e causa do tumor mamário (BENJAMIN et al., 1999). Então, exames acurados e adicionais são requeridos para ajudar na identificação de pacientes de alto risco. Recentes avanços na biologia do tumor têm identificado inúmeros marcadores que podem ser a base para desmistificação do tumor (DONNAY et al., 1995; GRAHAM & MYRES, 1999; SARLI et al., 2002).

Informações prognósticas podem ser obtidas através do grau histológico, avaliação da proliferação celular (Ki-67) (SARLI et al., 2002; ZACCHETTI et al., 2003; YANG et al., 2006), expressão de receptores hormonais (NIETO et al., 2000; MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2005; MILLANTA et al., 2006) e expressão aberrante da proteína

supressora de tumor P53 (GAMBLIN et al., 1997; RUNGSIPIPAT et al., 1999; LEE et al., 2004).

## **II.2 Fatores prognósticos**

### **II.2.1 Receptores de estrógeno e progesterona**

Progesterona e estrógeno têm papel crucial no controle da proliferação da glândula mamária e formação do tumor (ELLING & UNGEMACH, 1983; NICHOLSON et al., 1991). Em cães, a exposição prolongada da cadela a progesterona estimula a proliferação do epitélio mamário, tanto a progesterona exógena utilizada no tratamento contraceptivo, como a progesterona endógena originária do corpo lúteo durante a fase luteal. A progesterona é essencial para o crescimento e desenvolvimento da glândula mamária, mas também aumenta o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária. O efeito fisiológico desses hormônios é mediado principalmente por receptores expressos no tecido mamário (MOL et al., 1999).

Receptores de estrógeno e progesterona estão presentes tanto na neoplasia como no tecido mamário normal (RUTTEMAN et al., 1988; RUTTEMAN, 1990; DONNAY et al., 1993; 1995). Noventa e cinco por cento do tecido canino mamário normal apresenta receptores de progesterona e/ou estrógeno (DONNAY et al., 1995). Mais de 50% dos tumores mamários caninos (MaCEWEN et al., 1982) e 65-70% dos tumores de mama humanos (VAN ZWIETEN, 1984) expressam receptores de estrógeno e progesterona.

Tumores mamários de cães e humanos são controlados por hormônios. Sendo assim similaridades na dependência hormonal podem ser encontradas entre ambos os tumores (EVANS & PIERROPOINT, 1975; HAMILTON et al., 1977; MONSON et al., 1977; RUTTEMAN et al., 1988; RUTTEMAN, 1990; RUTTEMAN & MISDORP, 1993; DONNAY et al., 1995). A dependência hormonal dos tumores mamários caninos geralmente decresce com o aumento da malignidade, ou seja a alta proliferação celular ocorre em tumores malignos com baixa expressão de receptores de progesterona (GERALDES et al., 2000).

Análises dos receptores de estrógeno e progesterona tornaram-se aceitas e são ferramentas usadas para estabelecer o prognóstico e também para avaliar se o tratamento hormonal pode ser mais benéfico que a terapia citotóxica (THORPE et al., 1987; SARTIN et al., 1992; SNEAD et al., 1993).

Em tumores de mama humanos, a expressão do receptor de estrógeno alfa (ER- $\alpha$ ) é relacionada com o índice de proliferação do tumor, mensurada por imunomarcação com anticorpos Ki-67 e PCNA, e indica um bom prognóstico quando tratado com terapia endócrina (WINTZER et al., 1991; HURLIMANN et al., 1993; RUDAS et al., 1994). Displasia e tumores benignos diferem dos tumores malignos na expressão elevada de ER- $\alpha$  (INABA et al., 1984), e tumores que fazem metástase são freqüentemente negativos para ER (RUTTEMAN et al., 1988).

Nas últimas décadas os métodos bioquímicos vêm dando lugar a imunohistoquímica, método de diagnóstico bem menos oneroso e no qual se utiliza menos tecido. Além disso, a detecção dos receptores de estrógeno e progesterona é mais acurada nas técnicas *"in situ"*, já que esses receptores são preferencialmente localizados dentro do compartimento nuclear (PRESS & GREEN, 1988)

## **II.2.2 Índice de proliferação celular (Ki-67)**

As neoplasias, independentemente de suas causas primárias, apresentam distúrbios no controle do ciclo celular, o que acaba gerando um aumento na proliferação celular, perda da diferenciação e formação de massas tumorais (RABENHORST, 1994, FRAILE et al., 2003).

A detecção e quantificação das células em proliferação constituem parâmetros importantes no prognóstico de diferentes tumores, uma vez que a capacidade proliferativa tem sido importante na identificação de neoplasias, associada ao grau de malignidade (RABENHORST, 1994; SAKAI et al., 2002).

COTRAN et al. (2000) definem o índice de proliferação celular como a porcentagem de células de uma neoplasia que se encontram em proliferação. Uma forma de conhecer o índice de proliferação celular é a determinação de proteínas

específicas do ciclo celular, tal como Ki-67, cuja utilidade como fator prognóstico tem sido demonstrada no carcinoma mamário da mulher (SAHIN et al., 1991; GASPARINI et al., 1994). Na Medicina Veterinária, a avaliação de marcadores de proliferação celular, também tem sido sugerida como indicador de prognóstico, adicionados à classificação por critérios histopatológicos tradicionais (ZUCCARI et al., 2001).

O antígeno nuclear Ki-67 é uma proteína nuclear (345-395 kD) relacionada com o ciclo celular, expressa nas fases G1, S, G2 e na mitose (GERDES et al., 1984). Sua vida média é curta, de forma que não se expressa mais além da fase M (BRUNO & DARZYNKIEWICK, 1992).

Estudos correlacionam sua imunorreatividade com o tamanho tumoral e envolvimento de linfonodos (VERONESE & GAMBACORTA, 1991). De acordo com PEÑA et al. (1998), valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástase, morte pela neoplasia e menos tempo de sobrevida. A avaliação da fração do crescimento pelo índice proliferativo de Ki-67 é altamente preditiva no comportamento de várias neoplasias caninas e tem sido aplicado como um marcador de proliferação celular útil em muitas neoplasias humanas (MILLANTA et al., 2002; SAKAI et al., 2002).

Estudos recentes têm mostrado a expressão do Ki-67 em tecidos normais e tumorais em humanos. A porcentagem de células imunorreativas para esse anticorpo correlaciona bem com as características morfológicas de proliferação celular, particularmente índice mitótico e grau de diferenciação celular do tumor. Diante da presença de neoplasias indiferenciadas, o Ki-67 é o melhor marcador de proliferação celular atualmente disponível, permite estabelecer uma relação direta com o prognóstico (ABADIE et al., 1999; BARBOSA et al., 2003).

### **II.2.3 Gene p53**

Tanto os oncogenes quanto os genes supressores de tumor, podem levar à formação de tumores malignos como resultado final de uma mutação. Os oncogenes por serem ativados e os genes supressores de tumor por serem desativados. As

mutações dos oncogenes fazem com que as células passem a se dividir sem restrições, enquanto que as mutações dos genes supressores de tumor fazem com que haja a produção de proteínas defeituosas que não conseguem prevenir a replicação irregular das células, principalmente quando ocorre agressão ao DNA (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000).

Numerosos estudos têm sido focados na investigação do papel significativo do gene supressor de tumor p53, na formação de neoplasias humanas e caninas. O p53 é um gene supressor de tumor que codifica uma fosfoproteína nuclear de 53kD com atividade supressora de tumor (SCHMITT et al., 1998). As funções do p53 estão relacionadas às respostas aos constantes bombardeamentos genotóxicos que as células sofrem ao longo de suas vidas. A proteína p53 está diretamente relacionada ao bloqueio do ciclo celular, no caso de dano no DNA, apoptose ou diferenciação (BROOKS & GU, 2003; WU et al., 2006).

Acredita-se que mutações no gene p53 sejam as alterações mais comuns em tumores mamários caninos, além disso, estudos relacionados com tumores malignos em cães, indicam que a mutação no p53 é associada com progresso do tumor (LEVINE et al., 1991; GREENBLATT et al., 1994, VAN LEEUWEN et al., 1996; MAYR et al., 1998; VELDHOEN et al., 1999).

Sob condições de estresse, como irradiações gama e UV, calor e baixos níveis de oxigênio, o p53 se torna ativo, alterando sua conformação e se ligando a várias proteínas quinases, resultando na sua estabilização e aumento do potencial do DNA-ligante (GIACCIA & KASTAN, 1998). Segundo BROOKS & GU (2003) e SOKOLOWSKA et al. (2005), a estabilização do p53 nas células causam estresse crucial para a homeostase celular.

Por agir de tal forma, o p53 é chamado de “Guardião do Genoma”. Uma mutação do gene p53 causa perda dessa proteção celular, desestabiliza o genoma e permite a produção de uma proteína defeituosa, não funcionante, que se acumula na célula e é eliminada mais vagarosamente, o que permite a sua detecção pela técnica de imunohistoquímica (KANDIOLER-ECKERSBERGER et al., 2000; NAKANO et al., 2005; WU et al., 2006). Já em células normais a concentração da proteína está abaixo do limiar de

detecção por métodos de imuno-histoquímica. A imunorreatividade exacerbada desta proteína tem sido observada em um grande número de tumores, incluindo carcinomas mamários e está associada com a agressividade tumoral (SCHMITT et al., 1998; KUMARAGURUPARAN et al., 2006).

Carcinomas mamários em cães têm similaridades na prevalência, metástase e padrão da doença comparada com o tumor de mama em humanos (SARLI et al., 2002). Em humanos, mutações no gene p53 têm sido documentadas em tumor de mama (BERGH et al., 1995). Essas mutações foram detectadas em 15-34% dos casos e estão sendo consideradas um importante indicador de pobre prognóstico e menor sobrevida (BERGH et al., 1995; ELLEDGE & ALLRED, 1998). Algumas anormalidades do gene p53 vêm sendo documentadas em alguns tumores espontâneos, tais como carcinoma de tireóide, papiloma oral, adenoma da glândula adanal, osteossarcoma e linfoma em cães (DEVILLE et al., 1994; JOHNSON et al., 1998; VELDHOEN et al., 1998).

### **II.3 Infiltrado Inflamatório e imunidade tumoral**

O reconhecimento de uma célula tumoral pelo sistema imunológico pode se processar de várias maneiras distintas e complementares, e a resposta do hospedeiro ao que é estranho requer uma ação coordenada do sistema imune, envolvendo imunidade inata e adquirida (LUSTER, 2002). Os componentes principais da imunidade inata são: as barreiras físicas e químicas, células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) e matadoras naturais (NK) e as proteínas do sangue e citocinas (ABBAS et al., 2004). O sistema imune inato responde não somente para providenciar a primeira linha de defesa contra o microrganismo, mas também providencia o contexto biológico – o sinal perigo – ou seja, regulação positiva de citocinas, por exemplo, interleucina-12 (IL-12) e moléculas co-estimulatórias, entre elas a B7-2, que promovem a ativação da resposta imune adaptativa (GALLUCCI & MATZINGER, 2001; BLATTMAN, 2004).

As respostas imunes adaptativas são mediadas por moléculas do sangue, chamadas anticorpos, e por linfócitos T, que compõem os mecanismos efetores capazes de matar células tumorais “*in vitro*” (ABBAS et al., 2004). Nesse contexto, as

células apresentadoras de antígenos (APC), principalmente as células dendríticas (CD), ocupam uma posição central (CHAMMAS et al., 1999), apresentando os peptídeos aos linfócitos T, através das moléculas de MHC I e MHC II, na presença de moléculas co-estimulatórias. As células dendríticas são consideradas as células apresentadoras de antígenos mais eficientes. Elas são derivadas de células progenitoras da medula óssea e circulam por toda a corrente sanguínea como precursores imaturos (BERTINETTI & KOZINER, 2002).

Os linfócitos são as únicas células do corpo que expressam receptores de antígenos altamente diversos e que reconhecem uma ampla variedade de substâncias estranhas (ABBAS et al., 2004). Existem vários tipos diferentes de linfócitos, mas, na realidade, eles podem ser enquadrados em duas categorias básicas: linfócitos T e linfócitos B (ROITT et al., 2003).

Tumores malignos expressam antígenos que podem estimular e servir de alvos para a imunidade antitumoral. Didaticamente, eles podem ser divididos em: antígenos tumor específicos, que são expressos exclusivamente pelas células tumorais, estimulando a rejeição de tumores transplantados e têm sido demonstrados somente em modelos animais; antígenos associados a tumor, que são encontrados em células normais, mas acumulam-se em células tumorais (SHU et al., 1997; CHAMMAS et al., 1999).

Muitos estudos referentes ao papel das células inflamatórias na imunidade antitumoral têm focado sua habilidade em promover auxílio na indução da resposta imune. Tumores sólidos em humanos são freqüentemente infiltrados por linfócitos, principalmente células T. Têm-se observado grande número de antígenos associados a tumores causando a estimulação de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, as quais induzem a produção de citocinas, gerando lise de células tumorais (KIRKIN et al., 1998; ZENG, 2001). Além disso, há uma expansão de células T CD8<sup>+</sup> tumor-específico no sítio tumoral, vista em vários tumores, indicando provavelmente um incremento na resposta imune (PISARRA et al., 1999; ECHCHAKIR et al., 2000).

Nesse contexto, a atividade das células infiltradas no tumor tem sido intensivamente explorada. Essas células têm sido empregadas com finalidades

terapêuticas (WOLFEL et al., 1994; MIZUNO et al., 1996) e também com propósitos prognósticos (CLARK et al., 1989; O'SULLIVAN & LEWIS, 1994; CLEMENTE et al., 1996; ZHANG et al., 2003). De modo geral, é atribuído melhor prognóstico a pacientes com maior infiltrado peri e intratumoral, embora essa observação esteja sujeita a considerável debate (O' SULLIVAN & LEWIS, 1994). A presença do infiltrado linfocitário está associada à parada do crescimento do tumor em alguns casos, e até na sua remissão, quando ele não apresenta características metastáticas (HADDEN, 1999).

Embora o infiltrado linfocitário seja considerado uma manifestação da resposta imune contra o câncer, o papel central das células T na imunidade antitumoral ainda é controverso. A presença dos linfócitos no tumor tem sido correlacionada com o tamanho, estágio do tumor e a sobrevida do paciente em uma variedade de cânceres, incluindo os de cólon e reto, os de próstata e os carcinomas de estômago (VESALAINEN et al., 1994; SETALA et al., 1996; ROPPONEN et al., 1997). Correlação inversa foi descrita em outros tipos de tumores, como no carcinoma esofágico (SHIBAKITA et al., 1999) e no carcinoma renal, em que a presença de células T foi relacionada com baixa sobrevida dos pacientes (NAKANO et al., 2001).

O importante papel das células T como efetoras na imunidade antitumor foi primeiramente demonstrado em numerosos modelos utilizando ratos. Por exemplo, tumores induzidos pela luz ultravioleta (UV) são regularmente rejeitados por ratos normais, mas crescem progressivamente na ausência das células T (KRIPKE, 1974; SPELLMAN & DAYNES, 1981; WARD et al., 1990). Em pacientes humanos com melanoma, a rápida resposta dos TILs também tem significado prognóstico. Tem sido bem demonstrado que a imunidade mediada por células T é essencial na rejeição de tumores induzidos quimicamente ou por vírus (BOYSE et al., 1962; LECLERC et al., 1972; ROUSE et al., 1972; TEVETHIA et al., 1974; CHEEVER et al., 1986 KLEIN et al., 2003).

Um desses subtipos é o linfócito T citotóxico (CTL). Muitos tumores são positivos para o MHC I, mas negativos para MHC II, e CTLs são capazes de induzir a morte do tumor por reconhecimento direto de peptídeos antigênicos, apresentados por moléculas MHC I. Então, atenção especial a resposta imune antitumor foi preferencialmente dada

as células T CD8<sup>+</sup>. A função das células T CD8<sup>+</sup> como células efetoras na ação crítica contra as células tumorais é mostrada em vários estudos com modelos experimentais em ratos. Exemplo disso são experimentos realizados com tumores induzidos por luz UV em ratos, mostrando que as células citotóxicas T CD8<sup>+</sup> parecem ser requeridas na rejeição tumoral (WARD et al., 1990). Células T citotóxicas que matam células tumorais podem ser isoladas de camundongos depois de repetidas injeções intraperitoneais de células tumorais antigênicas, ou podem ser geradas “ex vivo” em cultura mista de linfócitos e células tumorais num período de sete dias (FEARON et al., 1990). Além disso, estudos sugerem que a imunização, usando adjuvante ou células dendríticas com peptídeos tumorais puro, pode resultar em eficaz imunidade antitumor, que é restrita ao MHC I (FELTKAMP et al., 1993; NOGUCHI et al., 1995). Portanto, células CD8<sup>+</sup> podem ser inquestionavelmente anunciadas como um dos principais subtipos de células T que construtivamente medeiam a resposta efetiva antitumor (YU et al., 2006).

Inegavelmente, células T CD4<sup>+</sup> são parte integral da imunidade adaptativa, mas o papel específico dessas células na montagem da resposta antitumor é assunto de debate. A função crítica das células T CD4<sup>+</sup> promovendo a imunidade tem sido consistentemente demonstrada por vacinas e experimentos desafio empregando anticorpos que promovem a depleção de células T CD4<sup>+</sup> ou usando camundongos CD4-knockout (FEARON et al., 1990; PAN et al., 1995). A literatura tem mostrado que similarmente as células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> tumor específicas podem reconhecer antígenos tumorais e migrar para o local do tumor em cânceres de humanos e de ratos (MONACH et al., 1995; PARDOLL & TOPALIAN, 1998; BECK-ENGESER et al., 2001). Entretanto, complicações surgem quando há o acúmulo de células T CD4<sup>+</sup> dentro do ambiente do tumor durante a progressão tumoral, o que aparentemente impede a função efetora das células T CD8<sup>+</sup> (BERENDT et al., 1980; BURSUKER & NORTH, 1984; AWWAD & NORTH, 1988; WANG et al., 2004). O fenótipo de células T CD4<sup>+</sup> que impede a resposta antitumor é atribuído a função regulatória dessas células.

Embora, as células T CD4<sup>+</sup> mostrem-se suficientes para eliminar células tumorais na ausência de células T CD8<sup>+</sup> em alguns tumores, (MONACH et al., 1995; BEATTY & PATERSON, 2000) isso é mais freqüente quando ambas as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são

requeridas para que haja efetiva rejeição tumoral (BEATY & PATERSON, 2000). Em parte, isso é devido a uma porção substancial de células tumorais expressarem somente moléculas MHC I, mas não moléculas MHC II, o que limita o reconhecimento direto por células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, o mecanismo efetor predominante na imunidade ao tumor é lisar diretamente as células tumorais apresentadas pelo MHC I aos CTL CD8<sup>+</sup>. O papel das células T CD4<sup>+</sup>, na resposta antitumor é freqüentemente auxiliar na ativação de células T CD8<sup>+</sup>, levando a destruição do tumor por CTL CD8<sup>+</sup>. A ajuda das células T CD4<sup>+</sup> aos CTL CD8<sup>+</sup> na imunidade antitumor pode ser dividida em indução inicial, manutenção efetora e memória (YU et al., 2006).

Recentes estudos sugerem que o tipo, e não a quantidade de células que infiltram o tumor podem ser determinantes cruciais de prognóstico (CURIEL et al., 2004). Como dito acima as células CD4<sup>+</sup> podem ser mais prejudiciais que favoráveis. Especificamente essa subpopulação de TILs podem prejudicar a habilidade do hospedeiro defender-se contra células malignas (MACHIELS et al., 2001; YU et al., 2005). Além disso, esse tipo de células T CD4 regulatórias (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), têm se mostrado como potentes inibidoras da resposta imune em várias enfermidades, tais como autoimunidade órgão específico ou infecção crônica, e a intolerância a transplantes (SAKAGUCHI et al., 1995; SHEVACH et al., 2001; BELKAID et al., 2002; MELONI et al., 2004).

Recentes trabalhos mostram que as T regulatórias (Tregs) infiltram massivamente os tumores, sugerindo que elas poderiam ter algum papel no controle da resposta imune local (CURIEL et al., 2004; VIGUIER et al., 2004). Entretanto, ainda não está claro como as células Tregs induzem a tolerância ao crescimento das células tumorais. Em camundongos infundidos com células T transgênicas específicas ao antígeno expresso pelo tumor, sugeriu-se que as células Tregs ajam nos linfonodos que drenam o tumor, reduzindo a freqüência de resposta específica das células T CD8<sup>+</sup> (KLEIN et al., 2003). Entretanto, injeções com anticorpos anti-CD4 diretamente na massa tumoral, ocasiona a regressão do tumor, sugerindo que as células Tregs podem exercer melhor sua função supressora no local do tumor (YU et al., 2005; AHMADZADEH & ROSENBERG, 2006).

O mecanismo pelo qual as células T medeiam sua função supressora ainda não é conhecido. Estudos recentes têm reportado que as células Tregs têm efeito direto na função das células T CD8<sup>+</sup>, suprimindo a liberação de grânulos citotóxicos (MEMPEL et al., 2006). Entretanto, as células Tregs têm mostrado um potente efeito supressivo na resposta de células CD4<sup>+</sup>, demonstrando assim que elas podem agir de várias maneiras, dependendo das diferenças nos modelos experimentais (CHAPUT et al., 2007).

Portanto, a hipótese impetuosa de que o influxo de linfócitos no local do tumor é invariavelmente benéfica para o paciente pode ser inapropriada. Muitos tumores não são eficientemente rejeitados, apesar de serem reconhecidos pelas células T CD4 e CD8 (BOON & VAN DER BRUGGEN, 1996; ROSENBERG, 1999). Os mecanismos que inibem a rejeição do tumor incluem além da ação supressora das células Tregs, aqueles mediados pelo próprio tumor, como a produção de TGF- $\beta$  derivado do próprio tumor ou moléculas solúveis relacionadas ao MHC I (GROH et al., 2002; PARDOLL, 2002). O estroma tumoral também pode impedir o fornecimento e expansão de células T eficientes tanto nos linfonodos de drenagem como no local do tumor (YU et al., 2004). A ausência de rejeição imunomediada incluem inadequada resposta das células T do hospedeiro, que pode ser devido a anergia ou deleção das células T (KURTS et al., 1997; BOURGEOIS et al., 2002), e inibição da resposta das células T por citocinas supressoras como a IL-10.

Acredita-se que citocinas expressas no microambiente de tumores são importantes mediadores tanto para a resposta imune do hospedeiro como para a sobrevivência dos tumores (ORTEGEL et al., 2002). O TGF- $\beta$  é uma importante citocina secretada freqüentemente pelas células tumorais, que inibe a proliferação de células B e T e a atividade citolítica das células NK (WAHL, 1994; KIM et al., 1996; REISS et al., 1999). O TGF- $\beta$  tem sido visto em vários tipos de tumores, atuando como um importante inibidor da resposta imune, ocasionando o crescimento do tumor bem como o escape do mesmo à vigilância imunológica (KIM et al., 1996; REISS, 1999).

Coletivamente, esses achados têm levado a um aumento do interesse do papel dos TILs na regulação do desenvolvimento do tumor. Anualmente, inúmeras pesquisas

são desenvolvidas tendo em vista as células inflamatórias que infiltram tumores e os fatores solúveis no ambiente tumoral, visando contribuir para melhoria dos conhecimentos sobre as neoplasias e suas relações com o hospedeiro.

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

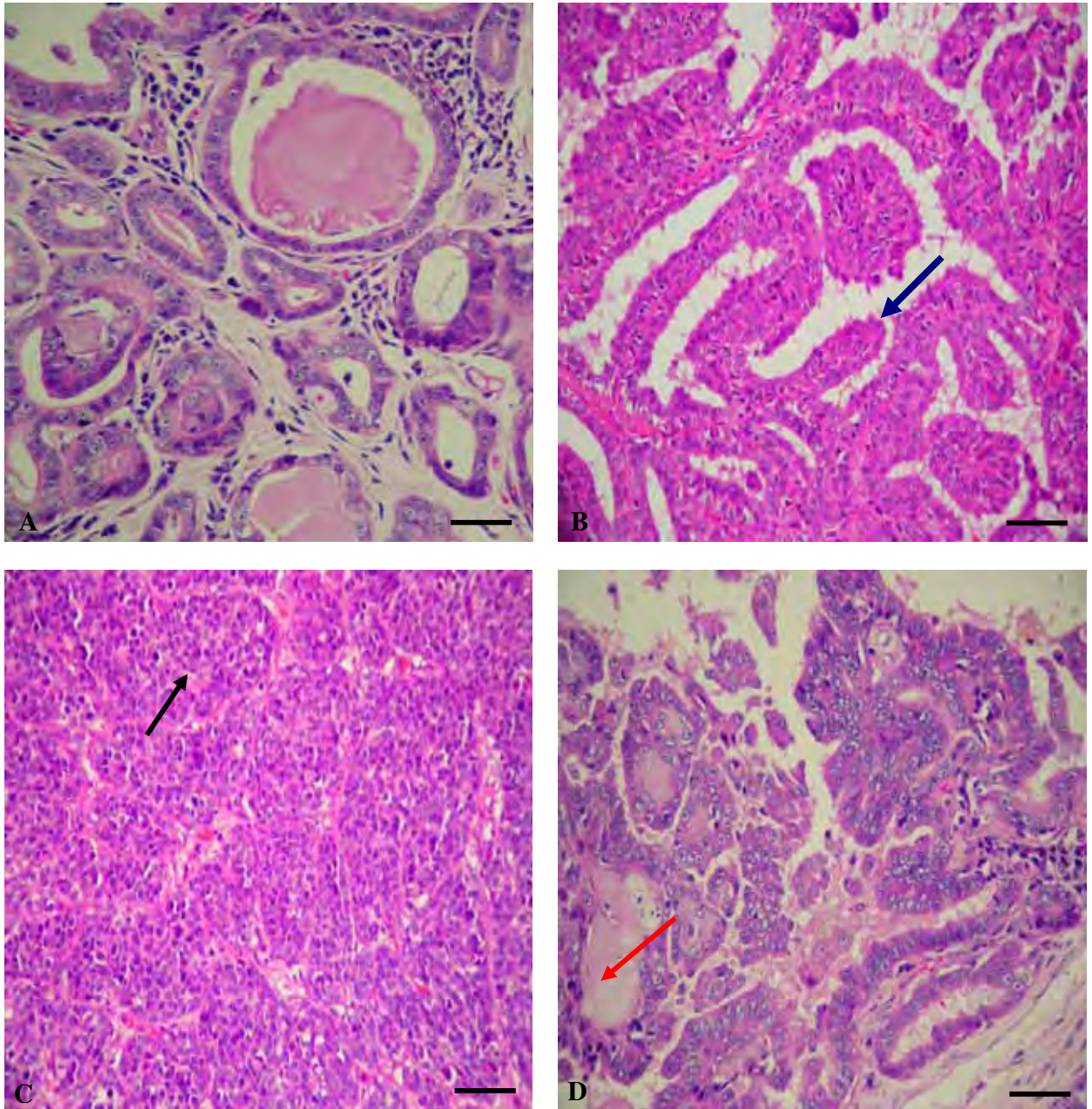
#### **III.1 Grupos Experimentais**

As amostras tumorais que constituíram os grupos experimentais foram oriundas de cães fêmeas, de várias raças e idades, que foram atendidas no serviço de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, da FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP nos anos de 2007 e 2008. Os fragmentos dos tumores foram encaminhados para o Departamento de Patologia Veterinária da mesma instituição para o diagnóstico histopatológico. Os espécimes classificados de acordo com MISDORP et al. (1999) como Carcinossarcoma, Carcinoma Sólido, Carcinoma Tubulopapilar, fizeram parte do presente trabalho. Utilizou-se também alguns casos da blocoteca do referido departamento. O número de casos selecionados para cada tumor foram 10 (n = 10), totalizando 30 animais.

Segundo MISDORP et al. (1999), os carcinomas simples são aqueles compostos por um ou outro tipo de célula, ou por células epiteliais ou por células mioepiteliais. Dentro dessa subdivisão eles podem ser classificados por incremento da malignidade em carcinoma tubulopapilar, sólido e anaplástico. Neste trabalho, como dito acima, foram utilizados os carcinomas tubulopapilar e o sólido.

O carcinoma tubulopapilar caracteriza-se pela formação de túbulos e ou projeções papilares (Figura 1B). Em cães, este tipo de carcinoma pode ser acompanhado por marcada proliferação de fibroblastos. Já o carcinoma sólido é caracterizado por apresentar as células tumorais dispostas em cordões ou ninhos (Figura 1C). Em alguns casos pode apresentar células com citoplasma vacuolizado.

O carcinossarcoma é considerado um tipo especial de carcinoma, é composto por células mesenquimais que é o componente dominante, mas também há a presença de células epiteliais malignas (Figura 1D).



**Figura 1** – Fotomicrografia de glândula mamária de cadela. A, glândula mamária normal. B, Carcinoma Tubulopapilar, notar as projeções papilares ( → ). C, Carcinoma sólido, observar as células em ninhos ( → ). D, Carcinosarcoma, notar células mesenquimais ( → ). (Método hematoxilina- eosina; Barra = 50um).

### III.2 Anticorpos

A padronização da técnica de imuno-histoquímica para a caracterização do infiltrado celular nos tumores foi feita empregando-se para isso os anticorpos monoclonais primários marcadores de linfócitos T CD3 (pan), CD4 (helper) e CD8 (citotóxico), de linfócitos B (CD79 $\alpha$ ), de células apresentadoras de antígeno (HLA-DR) e da linhagem macrófágica (CD-68), todos produzidos em camundongos contra antígenos humanos. O marcador de citocina TGF- $\beta$  e o receptor de interleucina-2 (IL-2r) tiveram seus anticorpos produzidos em coelho contra antígenos humanos. Os marcadores de prognóstico utilizados foram receptor de estrógeno (ER), índice de proliferação celular Ki-67, os quais são anticorpos monoclonais e receptor de progesterona (PR) e gene supressor de tumor (p-53), que são anticorpos policlonais (Tabela 1).

**Tabela 1 -** Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas de tumores mamários caninos, em cortes parafinados, com os respectivos clones e procedências.

ANTICORPOS	CLONES	PROCEDÊNCIA
CD3* (Linfócitos pan T)	F7.2.38	DAKO A/S, Denmark
CD4* (Linfócitos T helper)	NCL-L-CD4-1F6	Novocastra Laboratories
CD8* (Linfócitos T citotóxico)	NCL-L-CD8-295	Novocastra Laboratories
CD68* (Macrófagos)	PG-M1	DAKO A/S, Denmark
HLA-DR* (MHC II)	TAL1-B5	DAKO A/S, Denmark
CD79 $\alpha$ * (Linfócitos B)	HM57	DAKO A/S, Denmark
TGF- $\beta$ ** (Citocina TGF- $\beta$ )	SC-146	Santa Cruz Biotechnology
Ki-67* (Índice de proliferação celular)	MIB 1	DAKO A/S, Denmark
ER* (Receptor de estrógeno)	NCL-ER-6F11	Novocastra Laboratories
PR* (Receptor de progesterona)	NCL-PGR	Novocastra Laboratories
P53** (Gene p53)	NCL-p53-CM1	Novocastra Laboratories
IL-2R** (Receptor de interleucina 2)	SC-665	Santa Cruz Biotechnology

\* camundongo anti-humano \*\* coelho anti-humano.

### **III.3 Imuno-histoquímica**

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Jaboticabal – SP. Resumidamente, os tumores colhidos foram fixados em formol a 10%, tamponado com fosfato (pH 7,4), permanecendo nessa solução por um período máximo de 12 horas e depois foram processados e incluídos em parafina.

### **III.4 Padronização da técnica de imuno-histoquímica**

O método de imuno-histoquímica empregado foi o Complexo Estreptoavidina-Biotina Peroxidase (ABC), desenvolvido por HSU et al. (1981), com ligeiras modificações, de acordo com cada anticorpo utilizado (Tabela 2). Resumidamente, os cortes de tecido (5 um) foram desparafinizados, reidratados. Na seqüência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (solução de 50 mL de metanol, 50 mL de água destilada e 2 mL de água oxigenada 30 volumes) por 30 minutos. Após essa etapa, os cortes foram lavados por três vezes em solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01 M (pH 7,2), por cinco minutos. A recuperação antigênica pelo calor foi específica para cada anticorpo (Tabela 2). Após essa etapa, os cortes foram novamente lavados por três vezes com PBS, e, a seguir, os sítios inespecíficos bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free –catálogo nº X0909 – DAKO Corp.). Ato contínuo, os cortes foram recobertos com o anticorpo primário na diluição ótima (Tabela 2) e, então, incubados a 4°C por dezoito horas. Depois os cortes foram novamente lavados em PBS, como já descrito, e incubados com o anticorpo secundário biotilado, (Kit DAKO LSAB + System cat. N.º K0690) por trinta minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita nova lavagem com PBS para remoção do excesso de anticorpo e procedeu-se a incubação com o complexo streptoavidina-biotina, por trinta minutos (Kit DAKO LSAB + System cat. N.º K0690), à temperatura ambiente, para detecção do produto da reação. Realizou-se a revelação com o

cromógeno a base de diaminobenzidina (DAB), incubando por treinta segundos (cód. K3468- Dako Corporation, Carpinteria, USA).

**Tabela 2** - Tipo de recuperação antigênica, tempo e diluição utilizada para cada anticorpo primário.

ANTICORPO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	TEMPO	DILUIÇÃO
CD3**	Panela de pressão	5 minutos	1/100
CD4*	Banho-Maria 97°C	40 minutos	1/40
CD8*	Banho-Maria 97°C	40 minutos	1/40
CD-68**	Microondas	2 + 10 minutos*	1/100
HLA-DR**	Panela de pressão	5 minutos	1/300
TGF-β**	Microondas	2 + 10 minutos*	1/100
CD-79α**	Microondas	2 + 10 minutos*	1/100
Ki-67*	Banho-Maria 97°C	40 minutos	1/50
p-53**	Microondas	2 + 10 minutos*	1/100
ER**	Microondas	15 minutos♦	1/50
PR**	Microondas	15 minutos♦	1/50
IL-2r**	Microondas	2 + 10 minutos*	1/100

\* *Target Retrieval Solution 10x concentrate* - catálogo nº S1699-DAKO Corp.

\*\* Tampão Citrato pH 6,0

\* Potência máxima: 2 minutos / Potência mínima: 10 minutos, abrindo a cada 5 minutos para repor tampão

♦ Potência: 750W

Em seguida, a reação foi interrompida com a lavagem das preparações em água destilada, e feita a contracoloração com hematoxilina de Harris pura por um minuto, lavagem em água corrente e desidratação. Nesta última etapa, realizou-se passagens rápidas, em álcool etílico 85º, 95º, absoluto I e II, xilol I e II. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e observadas em microscópio de luz.

### **III.5 Contagem das células marcadas**

Para se quantificar a frequência da imunomarcação, foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e, em cada campo, foi contado na objetiva de 40x um total de 100 células entre as marcadas e não marcadas. Desses campos foram extraídas porcentagens de células marcadas em relação ao total.

### **III.6 Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos ao programa *Statistical Analysis System* (SAS). A independência dos resultados (expressão para os anticorpos Ki-67, p-53, TGF- $\beta$ , IL-2r, CD79-, CD3, CD4, CD8, CD68, MHC-II, PR, ER) com a classificação histopatológica e foi testada por meio de uma tabela de contingência 2X2 (Teste Qui-Quadrado).

## IV. RESULTADOS

### IV.1 Padrão de Imunorreatividade

O número total de tumores coletados foram 30 (10 carcinomas sólidos, 10 carcinomas tubulopapilar, 10 carcinossarcomas). Os percentuais de células imunomarcadas nos cortes histológicos dos tumores analisados são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** – Médias percentuais e desvio-padrão das contagens das células imunomarcadas pelos respectivos anticorpos em cada tipo de tumor.

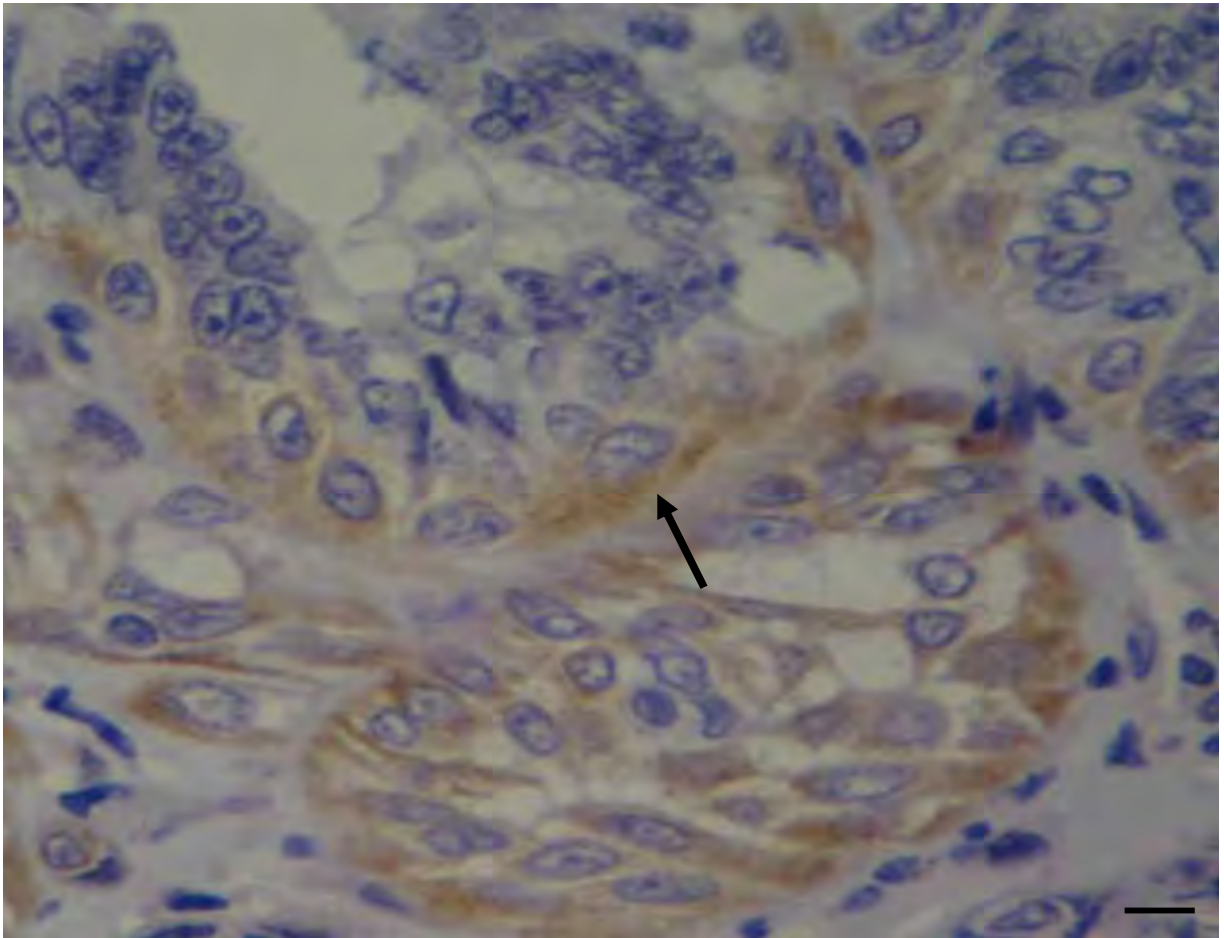
ANTICORPOS	CSS	CS	CTP
ER	9,75 ± 15,6	7,78 ± 10,6	3,38 ± 3,25
PR	3,53 ± 1,5	2,08 ± 1,38	3,30 ± 1,11
Ki-67	11,70 ± 6,02	18,8 ± 11,25	12,53 ± 12,8
P53	6,40 ± 2,92	9,58 ± 1,33	8,85 ± 1,68
MHC II	58 ± 21,05	27,5 ± 5,90	26,88 ± 6,27
IL-2r	6,6 ± 3,12	7,55 ± 2,80	6,25 ± 2,17
TGF-β	15,88 ± 5,01	12,83 ± 4,78	8,7 ± 2,05
CD79-α	2,9 ± 1,33	8,38 ± 4,47	8,28 ± 6,24
CD3	14,35 ± 3,53	12,23 ± 3,97	11,80 ± 2,95
CD4	7,58 ± 2,37	6,83 ± 2,97	6,73 ± 2,25
CD8	5,78 ± 2,32	5,0 ± 2,20	4,30 ± 1,47
CD68	0,93 ± 1,04	0,98 ± 1,32	1,73 ± 1,41

**CSS = Carcinossarcoma CS = Carcinoma Sólido CTP = Carcinoma Tubulopapilar**

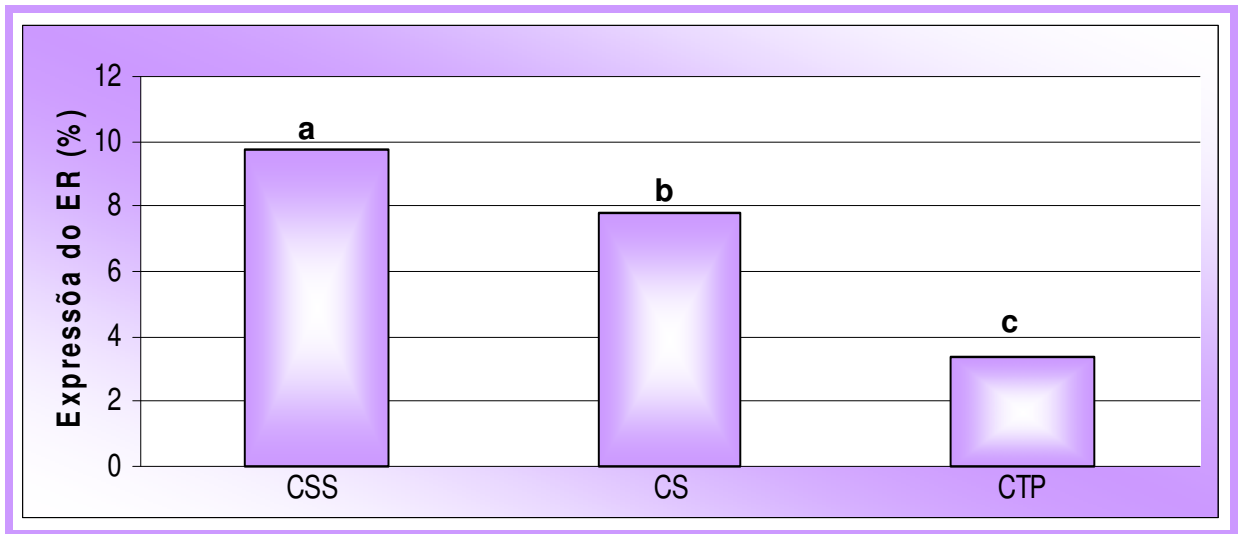
#### **IV.1.1 Padrão de imunorreatividade para o Receptor de Estrógeno (ER)**

As células que expressaram o ER apresentaram intensidade de coloração que variou de moderada a forte. Essa imunorreatividade foi vista no citoplasma e algumas vezes no núcleo de células epiteliais normais e neoplásicas (Figura 2). Fibroblastos, células ósseas e células cartilaginosas dos carcinossarcomas foram negativas para o ER.

O número de células marcadas com ER variou de acordo com a classificação histopatológica. Apresentando 9,75% de células marcadas no carcinossarcoma, 7,78% no carcinoma sólido e apenas 3,38% no carcinoma tubulopapilar (Figura 3). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade nos três tipos de tumores.



**Figura 2** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinosarcoma, anticorpo anti-ER. Notar intensa marcação citoplasmática em células epiteliais neoplásicas (seta). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um)

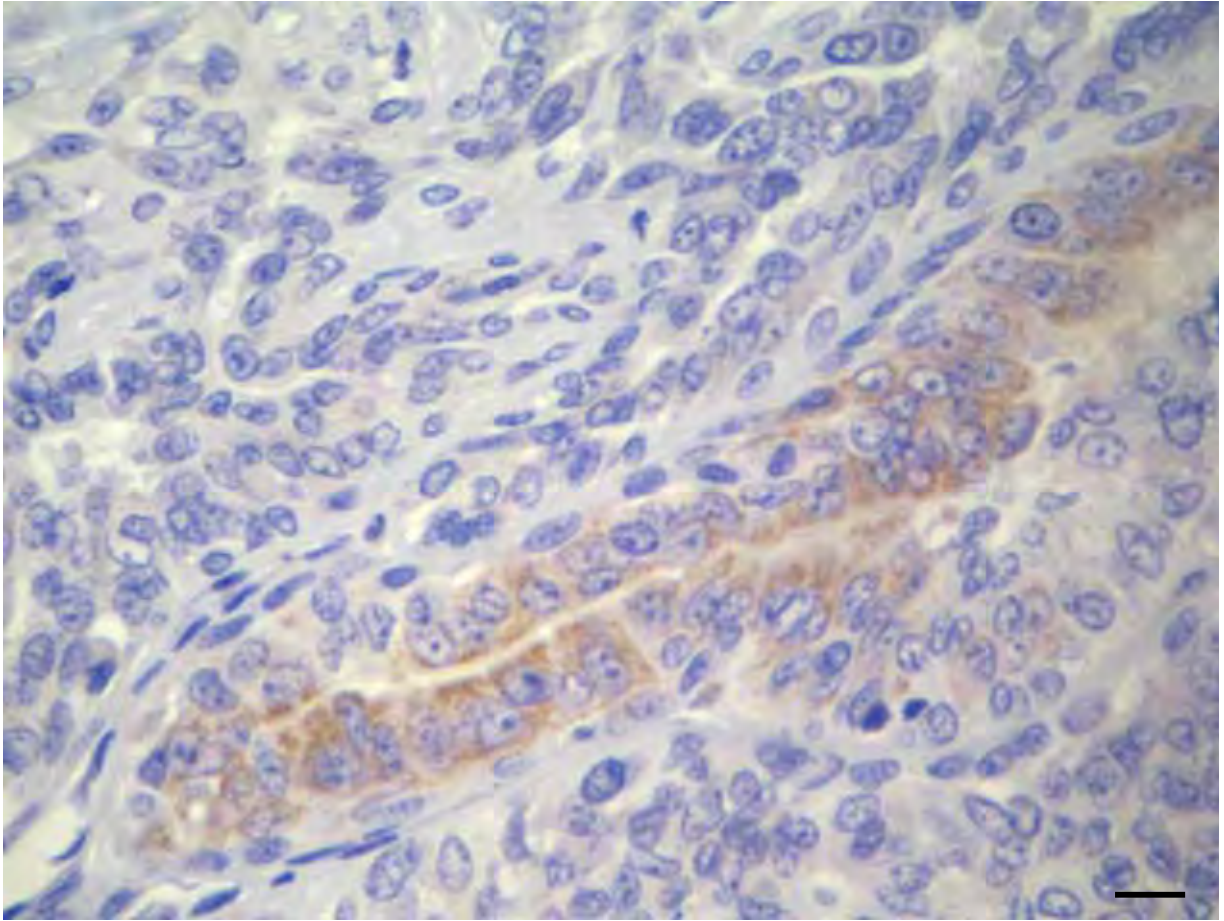


**Figura 3** – Imunomarcção do ER nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

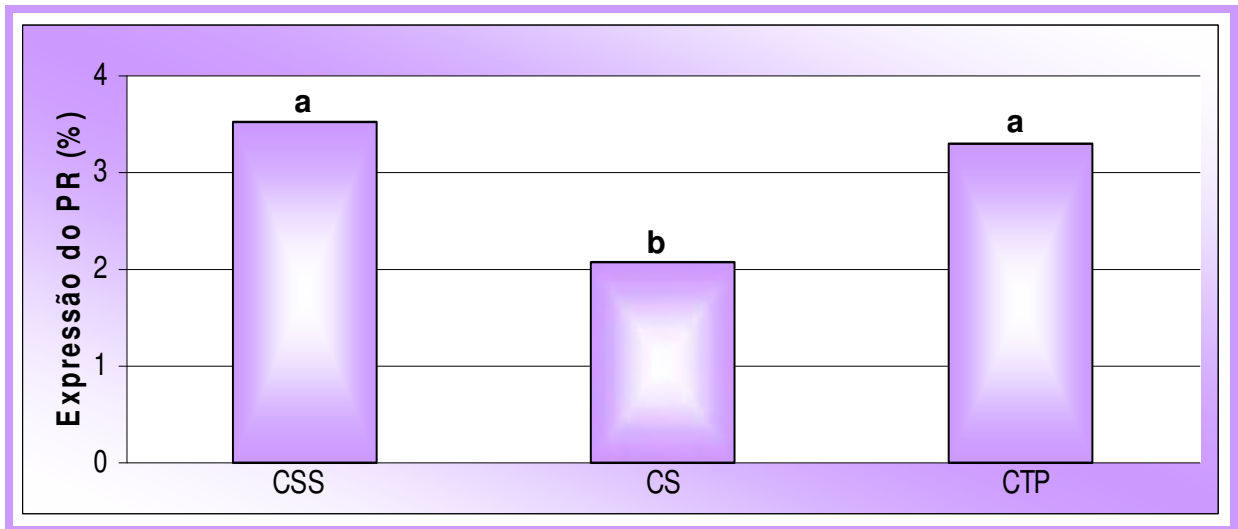
#### IV.1.2 Padrão de imunorreatividade para o Receptor de Progesterona (PR)

A intensidade de coloração vista nas células imunorreativas ao PR variou de fraca a moderada. A imunomarcção foi expressa no citoplasma de células epiteliais normais e neoplásicas (Figura 4), algumas células mioepiteliais também estavam marcadas. As células que apresentavam marcação citoplasmática não foram contadas, porque segundo a literatura, a progesterona localizada no citoplasma está inativa. Ao contrário do ER, havia mínima marcação nuclear.

Observou-se baixa imunorreatividade para o PR nas células dos carcinomas sólidos (2,08%). A expressão nos carcinomas tubulopapilares foi de 3,3% e de 3,5% nos casos de carcinosarcoma (Figura 5). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade apresentada pelos carcinosarcomas e pelos carcinomas sólidos e entre a imunorreatividade dos carcinomas sólidos e a dos carcinomas tubulopapilares.



**Figura 4** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti-PR. Notar marcação citoplasmática nas células epiteliais glandulares. (Método Estreptoavidina Biotina; Barra = 100um).

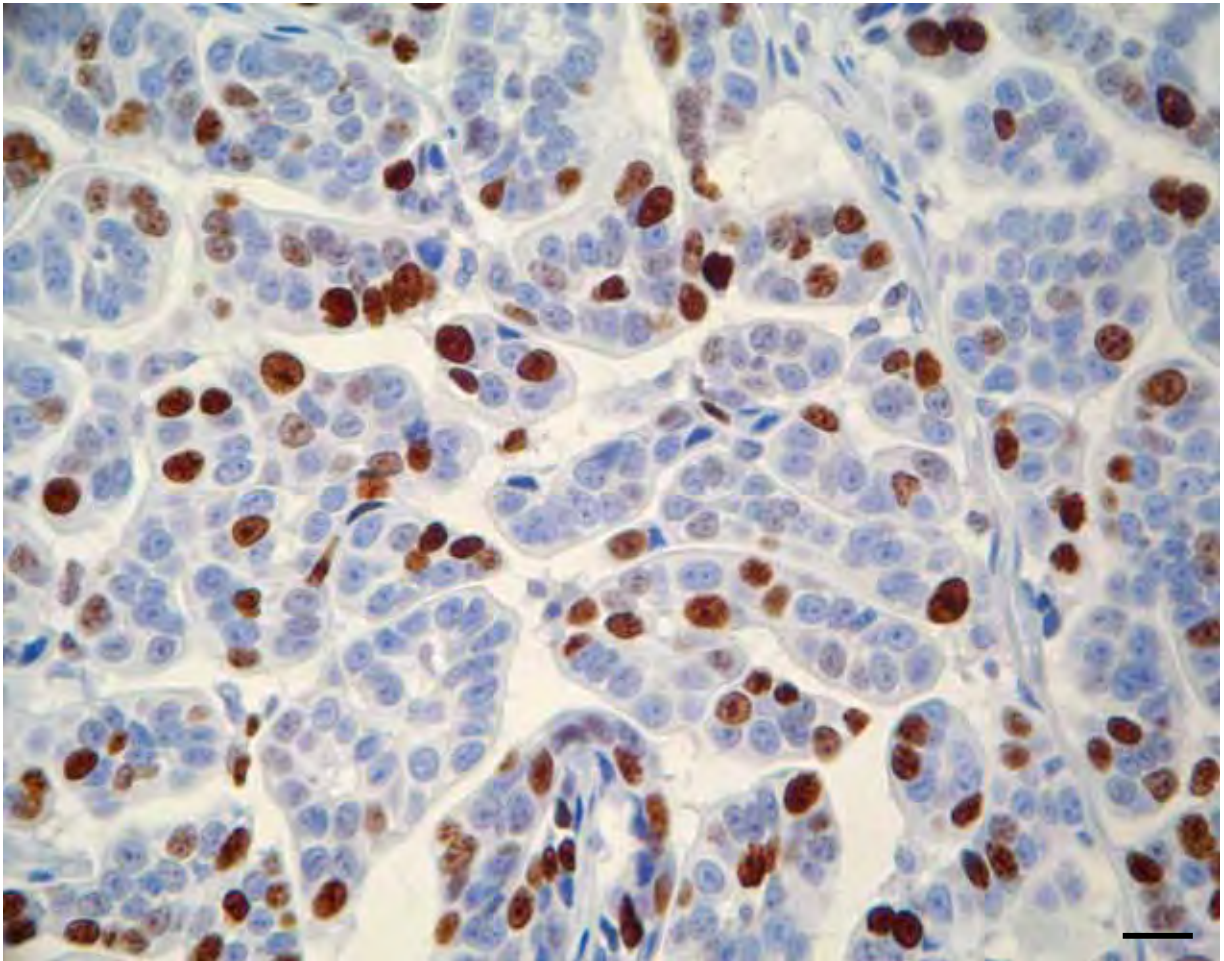


**Figura 5** - Imunomarcagem do PR nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

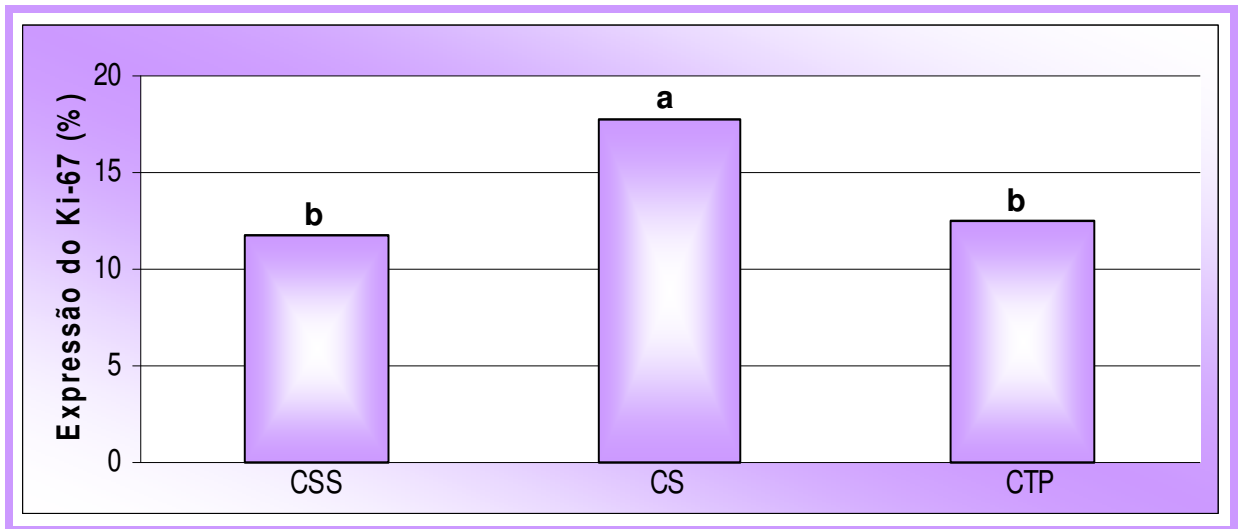
#### IV.1.3 Padrão de imunorreatividade para o Índice de Proliferação Celular (Ki-67)

A imunorreatividade para as células marcadas pelo Ki-67 foi inteiramente confinada ao núcleo em células mitóticas, e em alguns casos a marcação foi citoplasmática. Em algumas células havia marcação no nucléolo. A intensidade de coloração variou de moderada a forte, sendo mais intensa naquelas células que estavam em mitose (Figura 6).

Ocorreu baixa detecção da proteína Ki-67 nos casos de carcinossarcoma (11,7%) e carcinoma tubulopapilar (12,6%). Todavia 17,8% das células expressaram este antígeno no carcinoma sólido (Figura 7). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade celular dos carcinomas sólidos e a dos outros dois tumores.



**Figura 6** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no Carcinoma Sólido, anticorpo anti- Ki-67. Notar coloração mais intensa das células em divisão. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

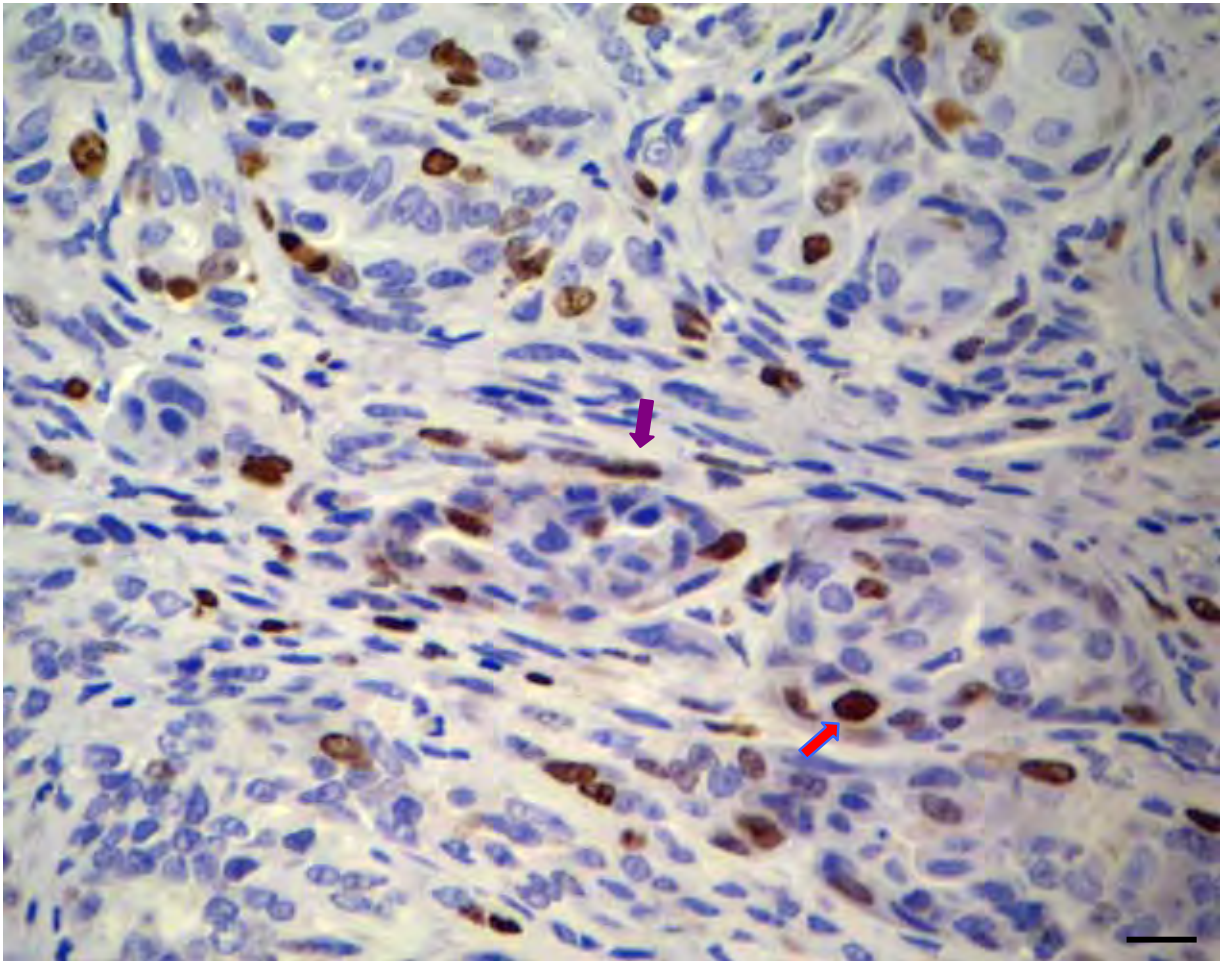


**Figura 7** – Imunomarcção da proteína nuclear Ki-67 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

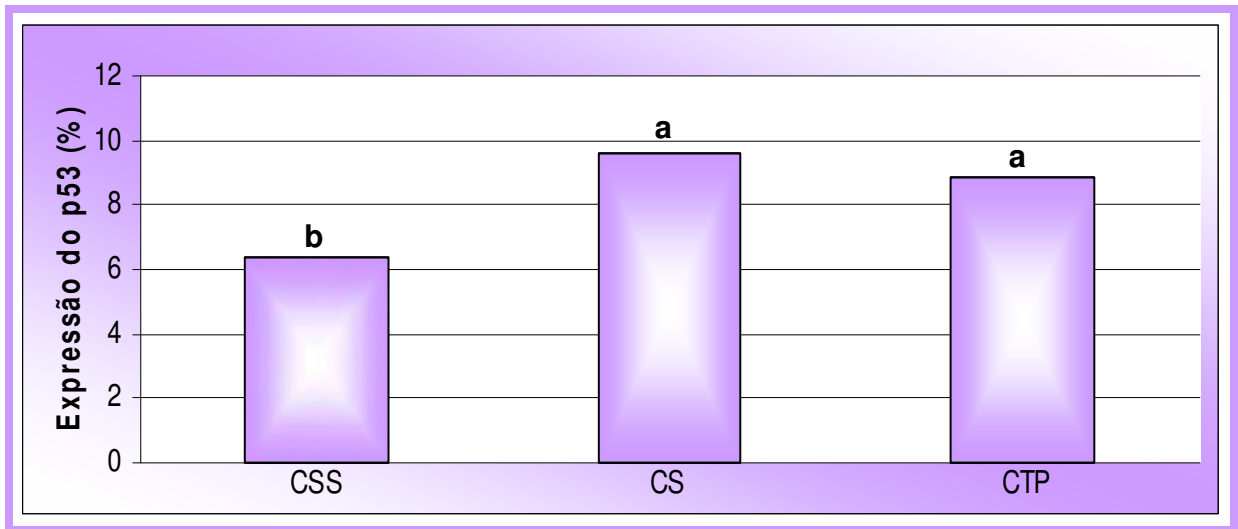
#### IV.1.4 Padrão de imunorreatividade para a proteína p-53 (p53)

A imunorreatividade para a proteína p53 foi evidenciada no núcleo das células epiteliais neoplásicas e também em células mioepiteliais (Figura 8). Alguns casos ocorreu mínima marcação do citoplasma. A intensidade de coloração das células variou de fraca a forte, sendo que as células normais apresentavam coloração bem menos intensa.

Observou-se baixa expressão (6,4%) nas células dos carcinossarcomas. No entanto, expressão para a p53 foi mais bem evidenciada nos carcinomas sólidos (9,6%) e nos carcinoma tubulopapilares (8,8%) (Figura 9). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos carcinossarcomas e a dos carcinomas sólidos e tubulopapilares.



**Figura 8** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinosarcoma, anticorpo anti-p-53. Notar marcação em células epiteliais neoplásicas (→) e também mioepiteliais (→). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

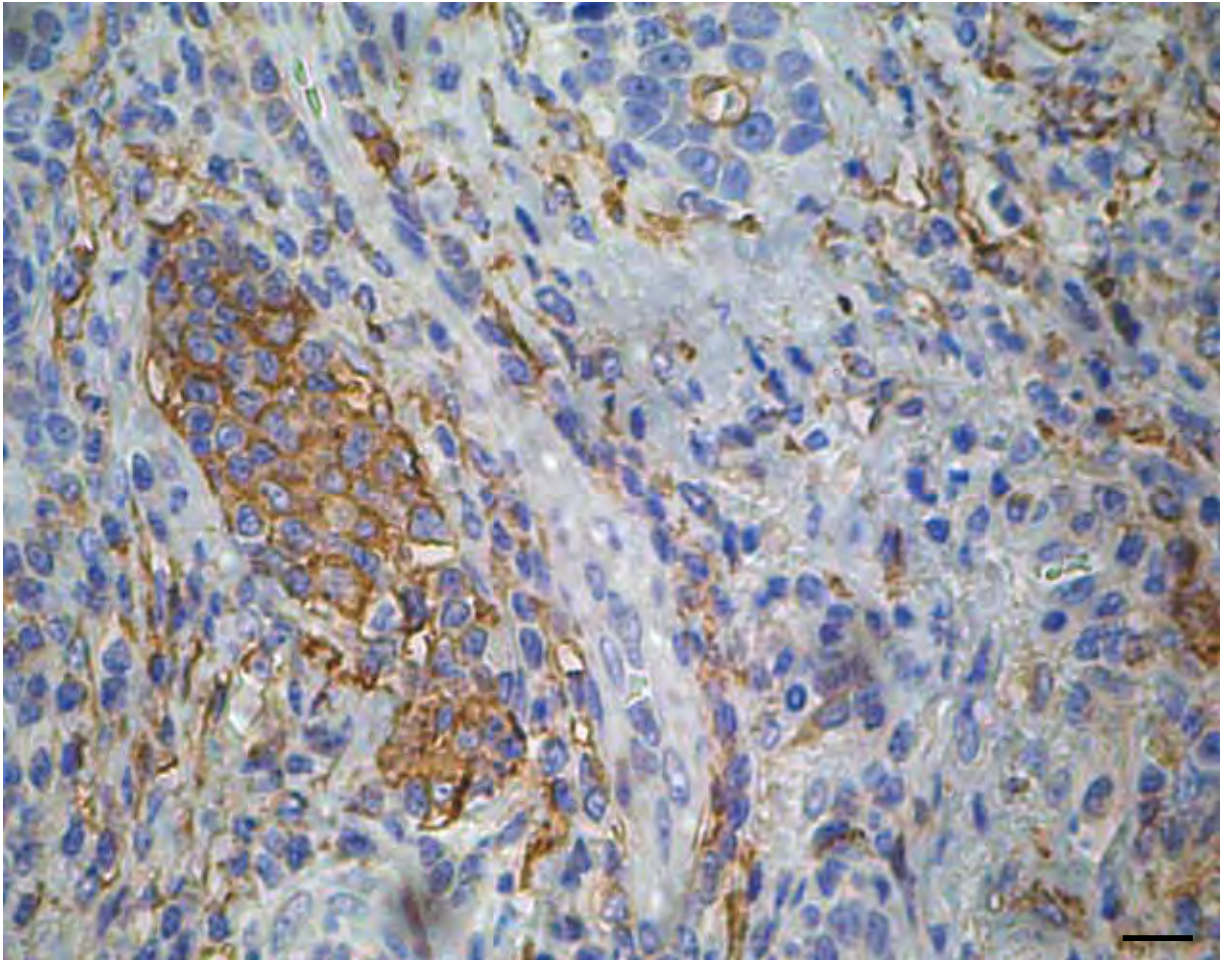


**Figura 9** – Imunomarcção da proteína p-53 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

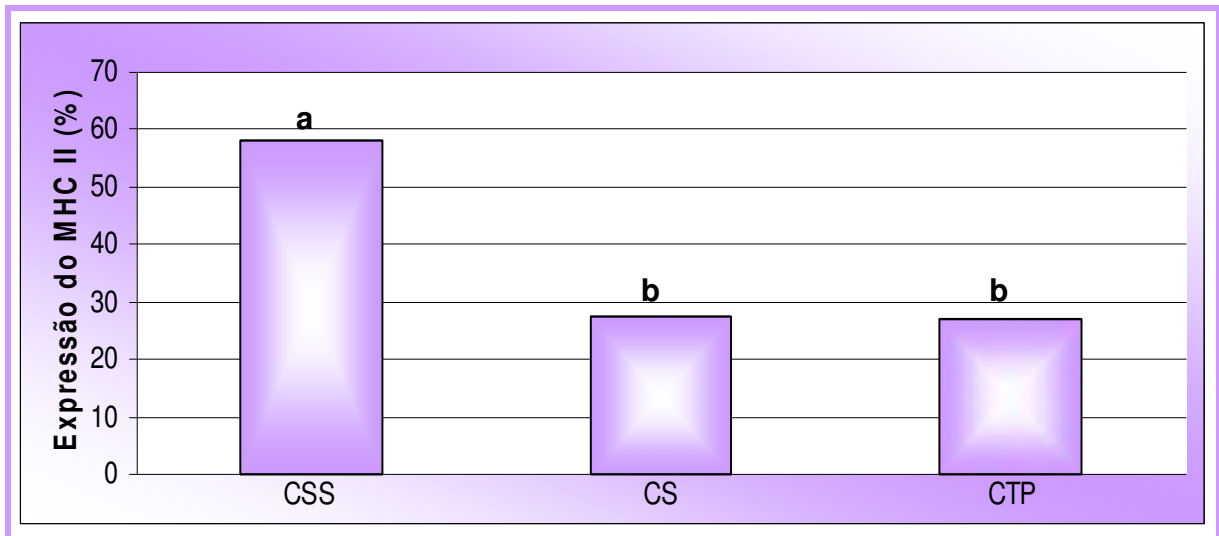
#### IV.1.5 Padrão de imunorreatividade para o Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC-II)

A marcação da molécula MHC II foi vista em um grande número de células que se encontravam espalhadas por todo o tecido tumoral. Observou-se imunomarcção granular no citoplasma das células epiteliais normais e neoplásicas (Figura 10), células mioepiteliais, linfócitos, fibroblastos e também das células mesenquimais dos carcinossarcomas. A intensidade de coloração variou de fraca, moderada a forte nos diferentes grupos.

Ocorreu elevada imunorreatividade do MHC-II nos carcinossarcomas (58%), já nos outros tumores malignos essa concentração caiu para 27,5% nos casos de carcinoma sólidos e 26,8% nos carcinomas tubulopapilares (Figura 11). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos carcinomas sólidos e tubulopapilares.



**Figura 10** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinosarcoma, anticorpo anti- MHC-II. Notar marcação do citoplasma de células epiteliais neoplásicas. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

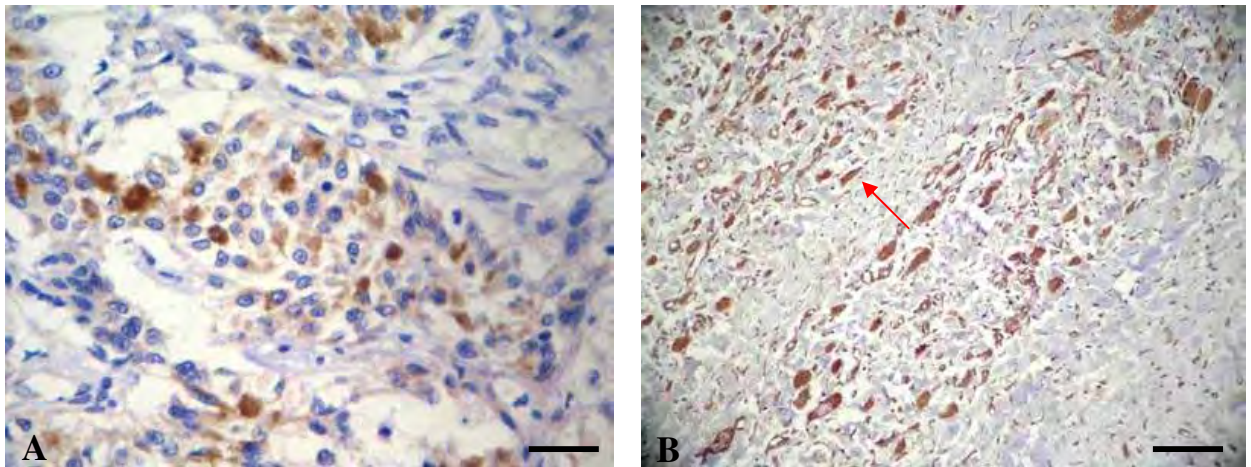


**Figura 11-** Imunomarcção da molécula MHC-II nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

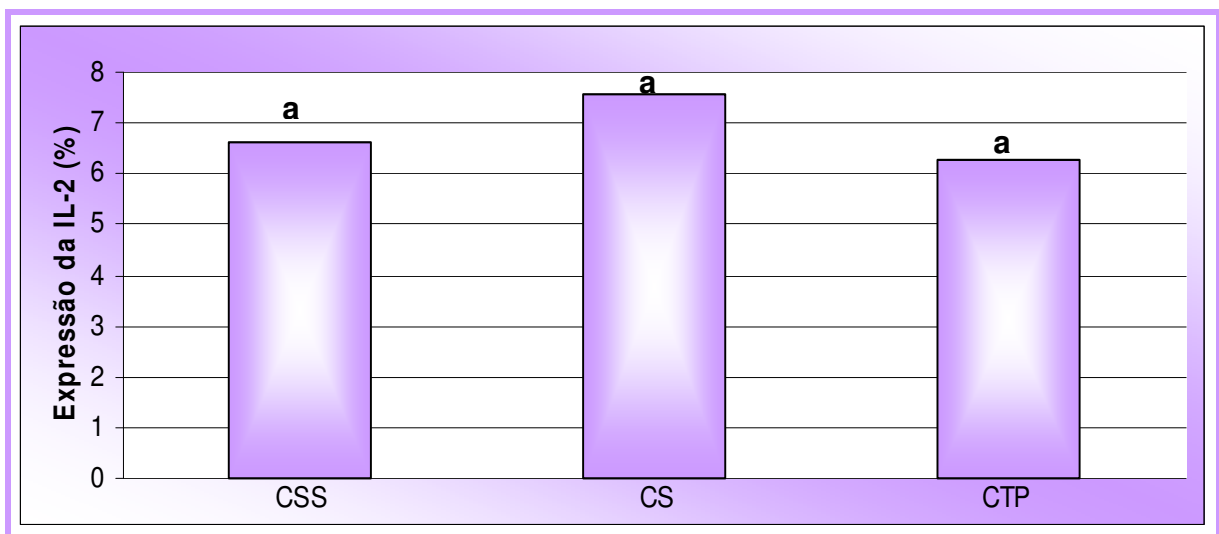
#### **IV.1.6 Padrão de imunorreatividade para o receptor de IL-2 (IL-2R)**

A marcação com o anticorpo anti-IL-2R, foi vista em células epiteliais e mioepiteliais neoplásicas (Figura 12A), e também no citoplasma de fibroblastos presentes nos carcinossarcomas (Figura 12B), linfócitos também estavam marcados.

Observou-se baixa imunorreatividade para os três tipos de tumores. Foram encontradas 7,6% de células marcadas nos carcinomas sólidos, 6,6% nos carcinossarcomas, 6,3% nos carcinomas tubulopapilares (Figura 13). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos tumores.



**Figura 12** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica do carcinosarcoma, anticorpo anti- IL-2r. Em A, algumas células epiteliais neoplásicas intensamente coradas. Em B, marcação intensa em citoplasma de fibroblastos (seta). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 50um).

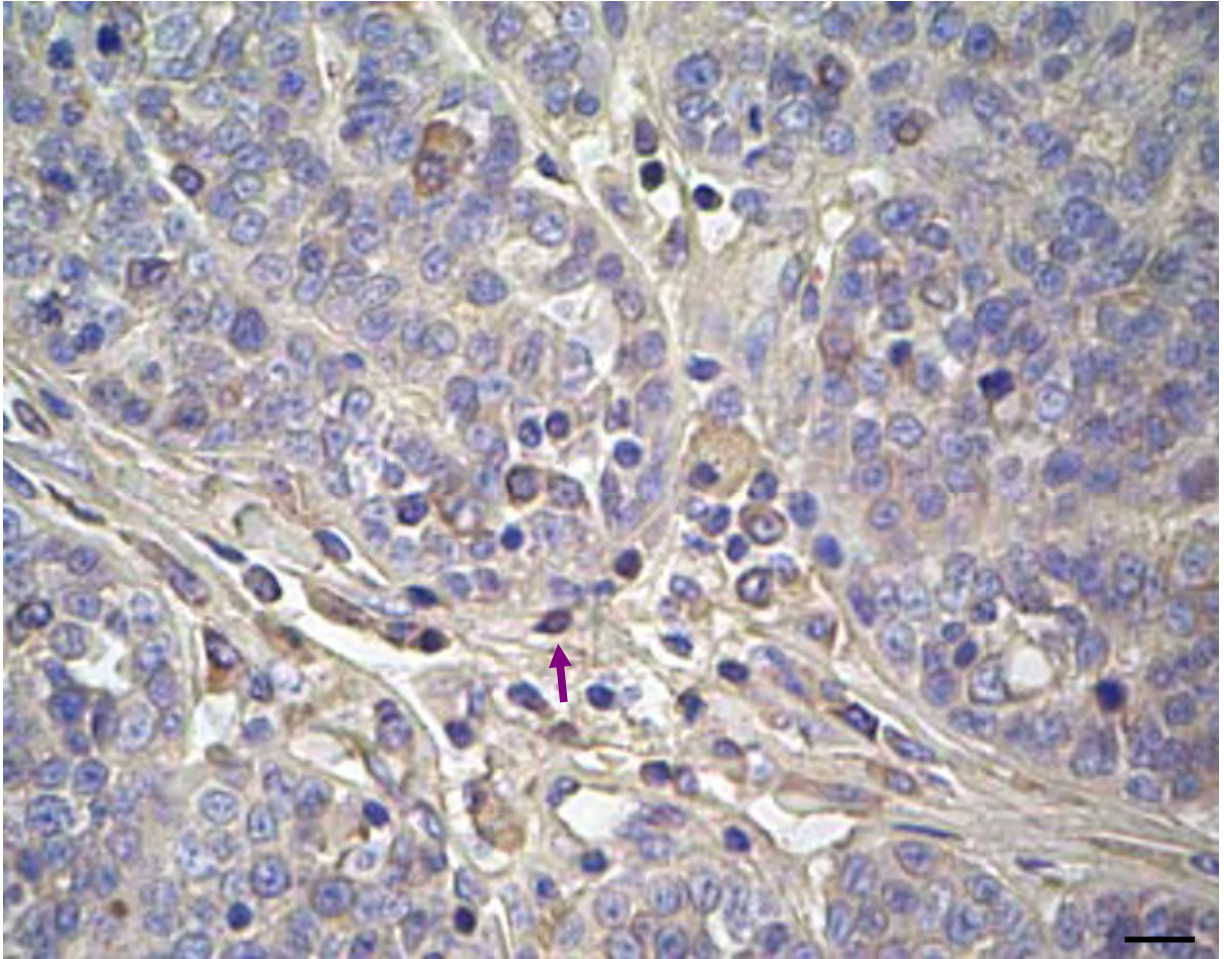


**Figura 13** – Imunomarcção da IL-2r nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

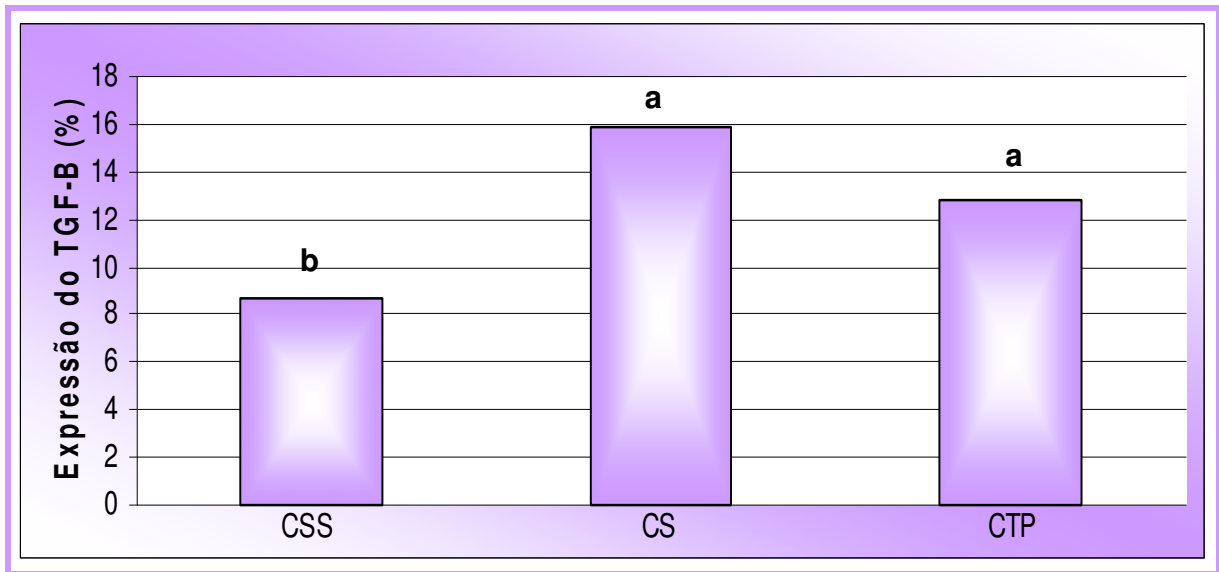
#### **IV.1.7 Padrão de imunorreatividade para o Fator de Crescimento Transformador $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

As células epiteliais neoplásicas expressaram a citocina TGF- $\beta$  tanto na membrana quanto no citoplasma, sendo bem definida a marcação citoplasmática (Figura 14), alguns linfócitos também foram reativos para esse marcador. A intensidade de coloração variou de fraca a moderada.

Observou-se imunomarcção em apenas 8,7% das células nos carcinossarcomas, 12,8% nos carcinomas tubulopapilares e 15,9% nos casos de carcinoma sólido (Figura 15). Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre a imunorreatividade dos carcinomas tubulopapilares e a dos carcinomas sólidos.



**Figura 14** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinosarcoma, anticorpo anti-TGF- $\beta$ . Notar a marcação de linfócitos no tecido conjuntivo (seta). (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

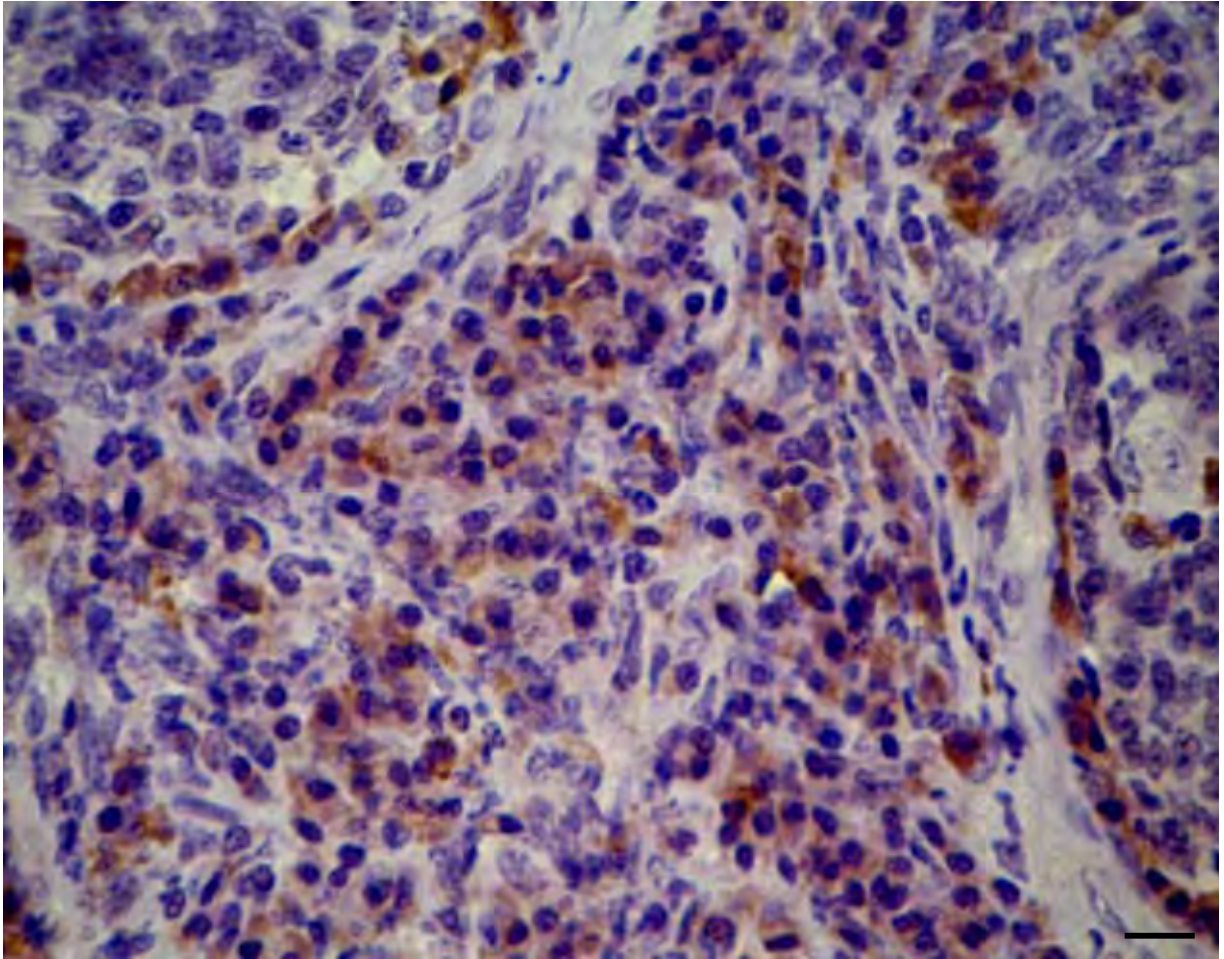


**Figura 15** – Imunomarcção do TGF- $\beta$  nas neoplasias mamárias de cadela. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

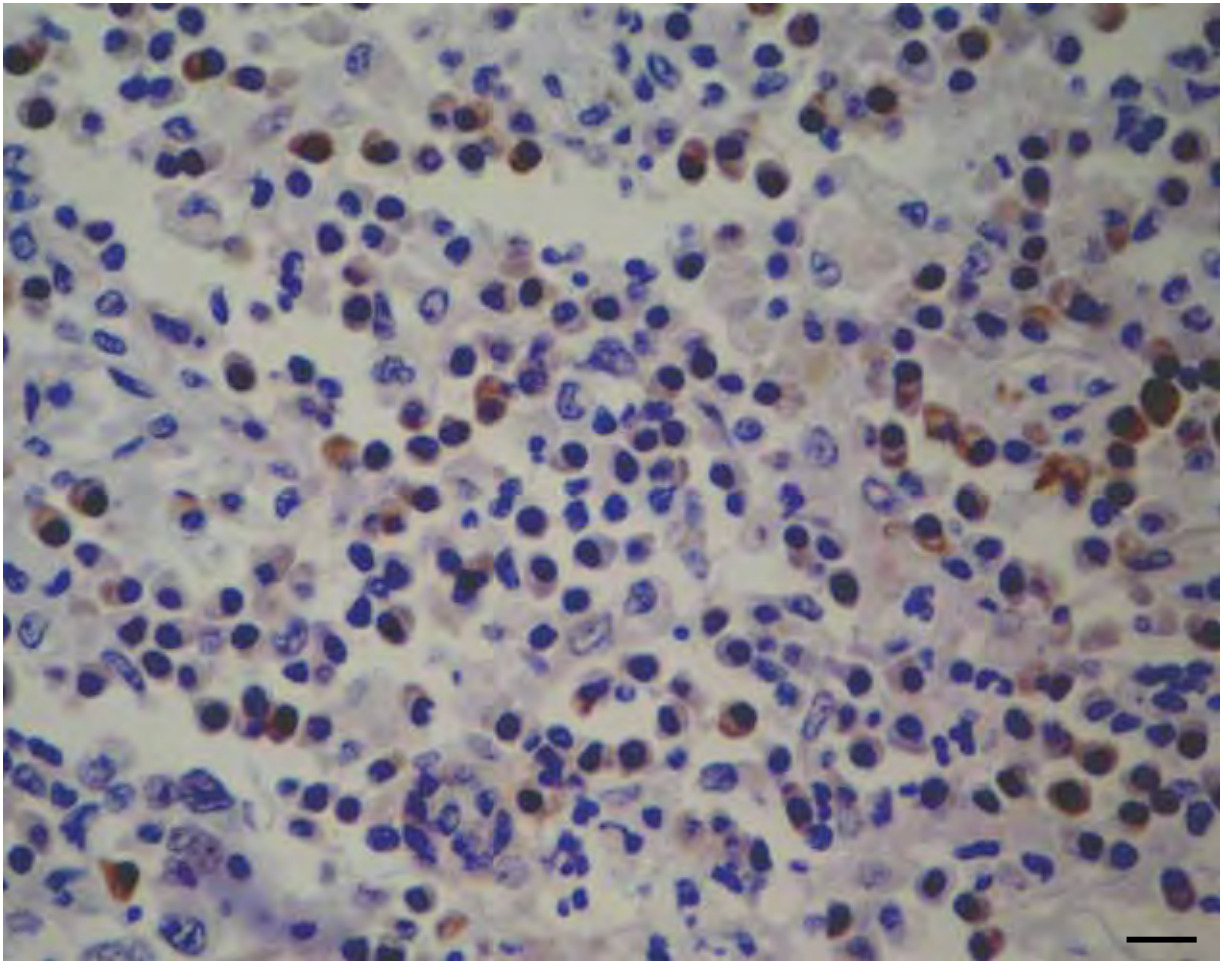
#### IV.1.8 Padrão de imunorreatividade para os Linfócitos B (CD79- $\alpha$ )

Ao examinar a presença das células marcadas pelo anticorpo anti-CD79 $\alpha$ , constatou-se que elas estavam localizadas em sua maioria no infiltrado inflamatório que circundava as células tumorais (Figura 16). Observaram-se também alguns plasmócitos imunorreativos espalhados pelo tumor (Figura 17). A imunomarcção citoplasmática era homogênea, apresentando células bem delimitadas, com coloração que variou de moderada a forte.

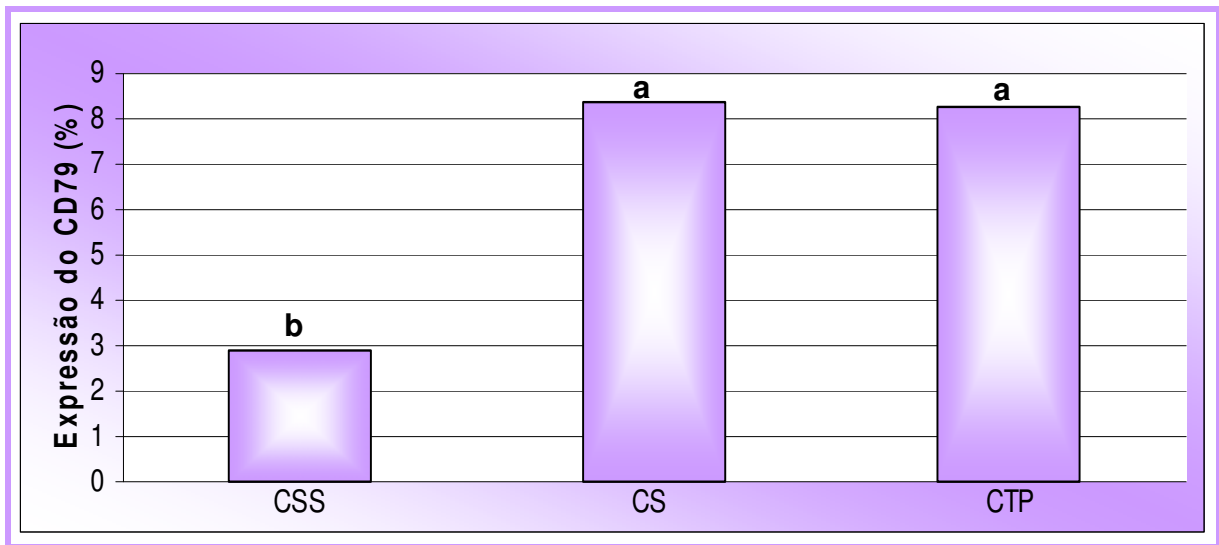
Os carcinossarcomas apresentaram baixa imunorreatividade (2,9%). Já nos outros dois tumores malignos a expressão para o CD79- $\alpha$  foi melhor evidenciada. 8,4% nos casos de carcinoma sólido e 8,3% nos carcinomas tubulopapilares (Figura 18). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre o carcinossarcoma e os demais tumores.



**Figura 16** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti CD79- $\alpha$ , notar marcação de linfócitos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Peroxidase; Barra = 100 $\mu$ m).



**Figura 17** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma tubulopapilar, anticorpo anti CD79- $\alpha$ . Notar marcação em plasmócitos (➡). (Método Estreptoavidina Peroxidase; Barra = 100um).

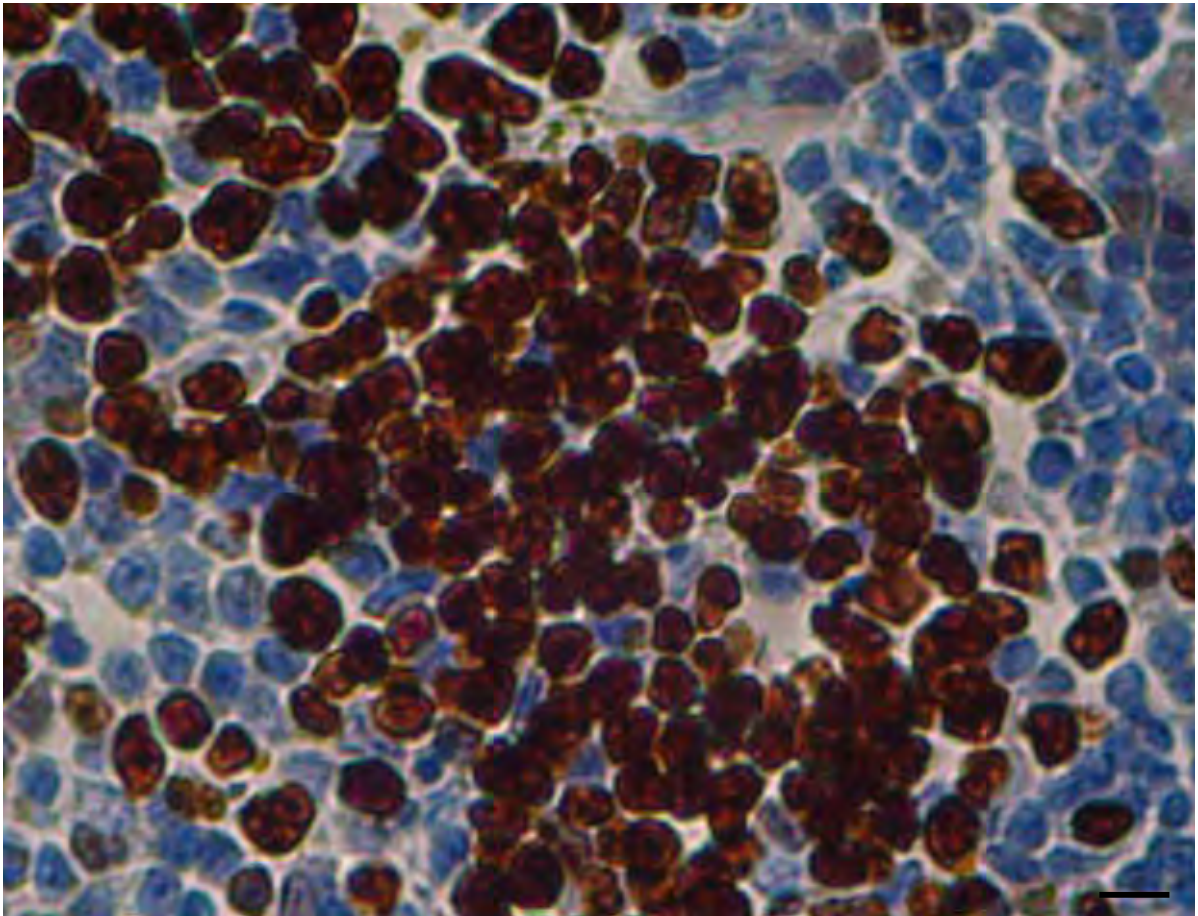


**Figura 18** - Imunomarcção do CD79- $\alpha$  nas neoplasias mamárias de cadela. Grupos de tumores seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

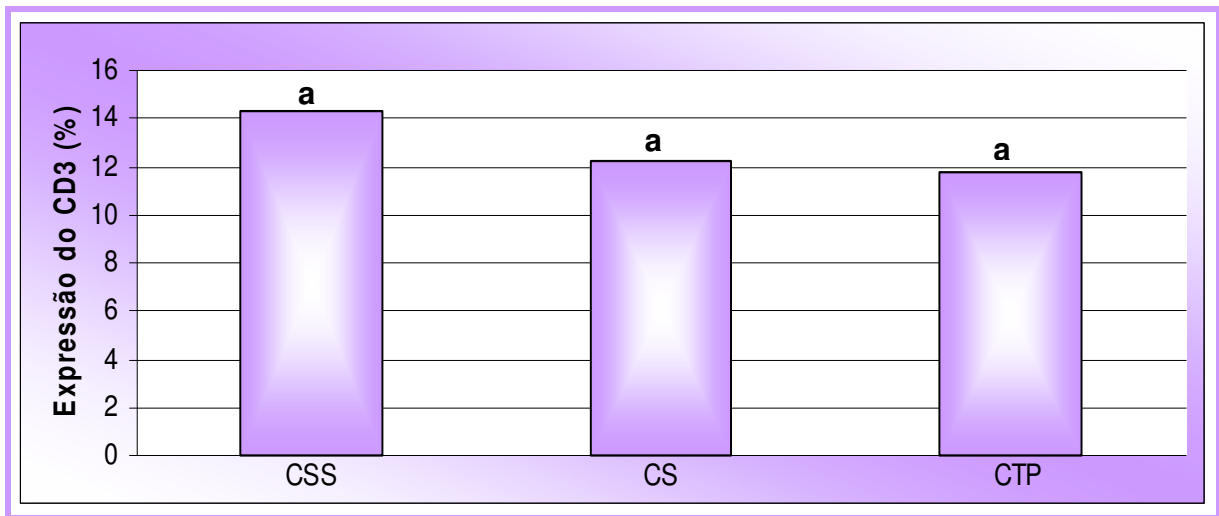
#### IV.1.9 Padrão de imunorreatividade para os Linfócitos pan T (CD3)

O anticorpo anti-CD3 reagiu com linfócitos localizados intra e peritumorais. As células CD3<sup>+</sup>, em sua maioria, encontravam-se distribuídas no tecido tumoral; contudo, nos tumores em que havia menor quantidade de células marcadas, elas estavam junto às trabéculas de tecido conjuntivo. O citoplasma apresentava-se bem delimitado, exibindo uma coloração de fraca a moderada intensidade (Figura 19).

A imunomarcção nos tumores malignos foi maior que nos benignos. Observou-se 14,3% de células marcadas nos carcinossarcomas, 12,2% nos carcinomas sólidos e 11,8% nos carcinomas tubulopapilares (Figura 20). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos tumores.



**Figura 19** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma sólido, anticorpo anti-CD-3. Notar a marcação citoplasmática dos linfócitos T no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

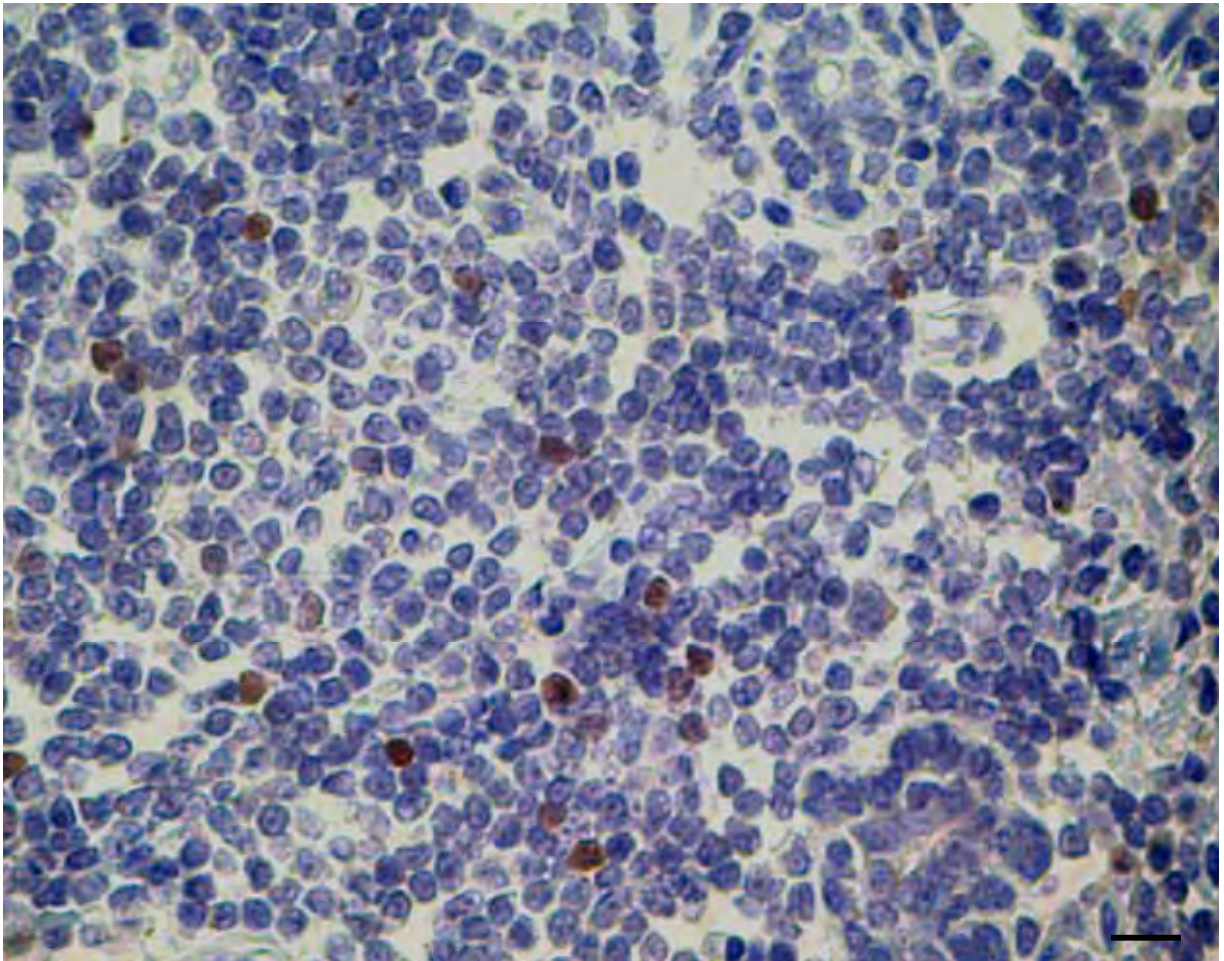


**Figura 20** – Imunomarcção do CD3 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

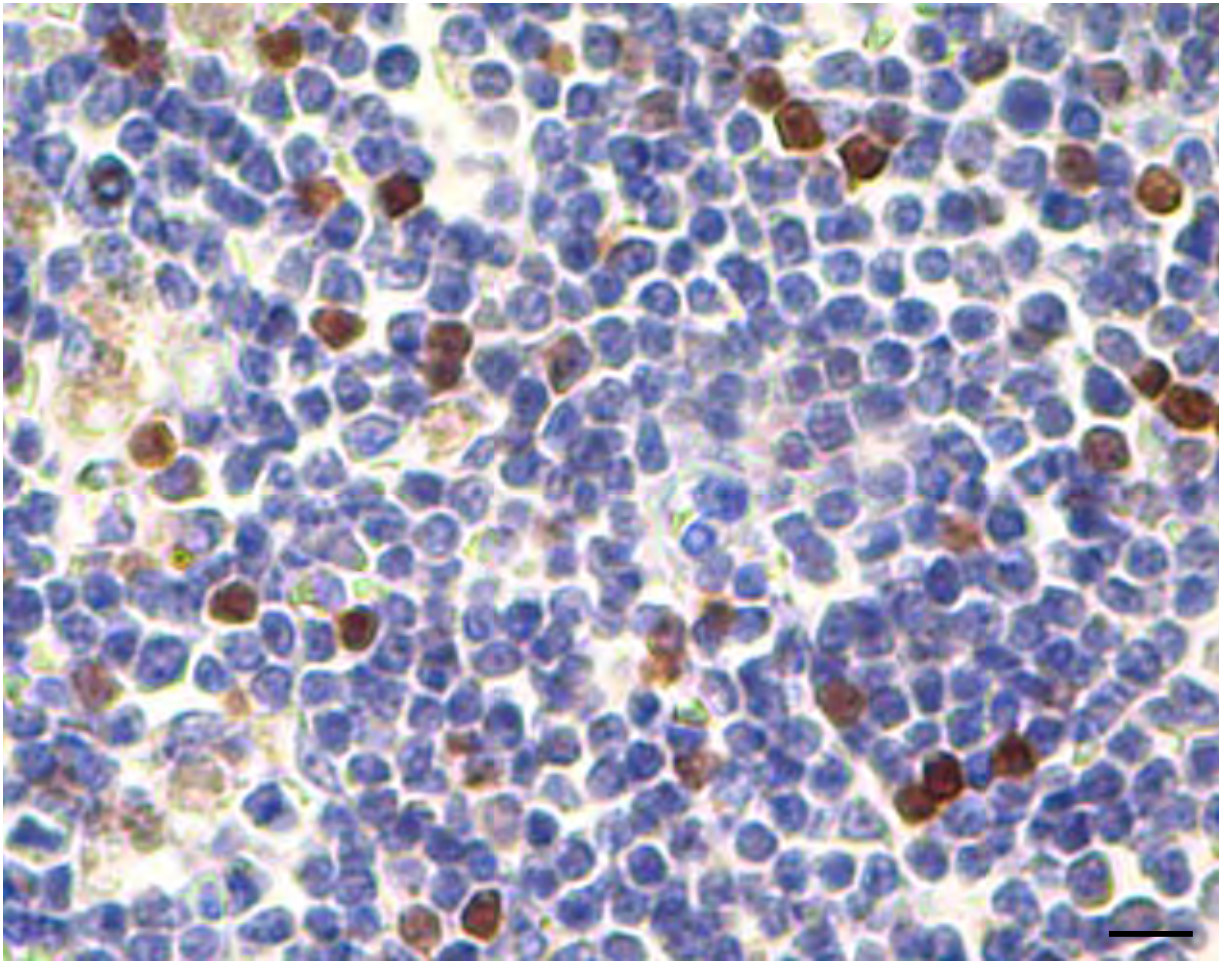
#### IV.1.10 Padrão de imunorreatividade para os Linfócitos T Helper (CD4)

Os linfócitos marcados pelo anticorpo anti-CD4 estavam localizados em sua maior parte no infiltrado inflamatório que circundava as células tumorais (Figura 21), algumas vezes foram vistos espalhados pelo tecido tumoral (Figura 22). Apresentavam marcação nuclear bem definida e raras vezes apresentavam mínima marcação citoplasmática. A intensidade de coloração variou de moderada a forte.

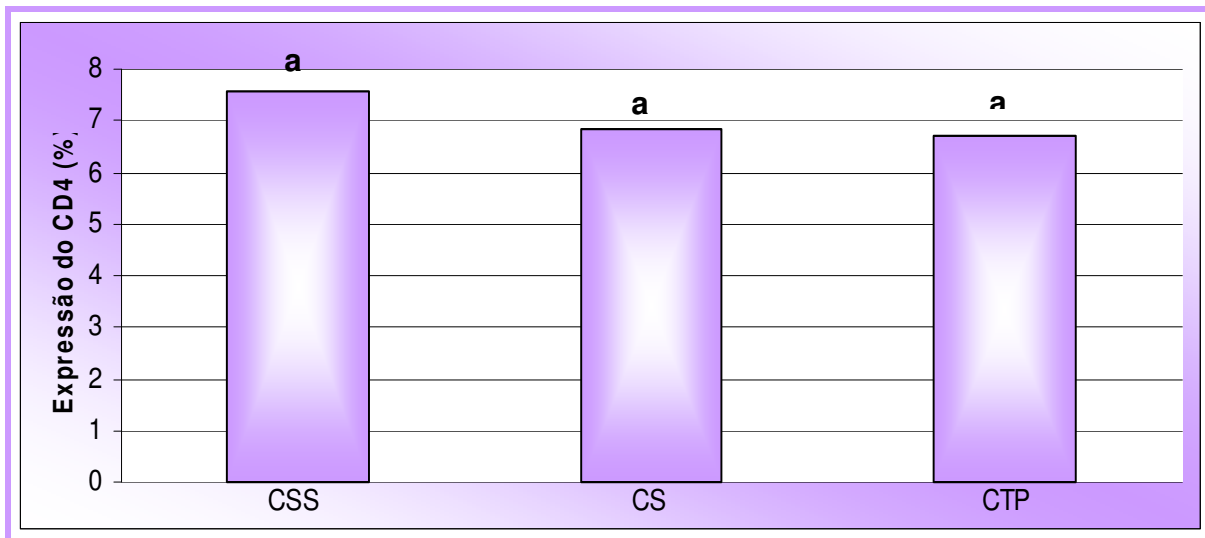
Da mesma forma que o CD3, a maior concentração de células reativas foi vista nos carcinossarcomas (7,6%), seguido pelos carcinomas sólidos (6,8%) e carcinomas tubulopapilares (6,7%) (Figura 23). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos tumores.



**Figura 21** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em Carcinoma Sólido, anticorpo anti- CD-4. Notar a presença de linfócitos T helper no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).



**Figura 22** – Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em Carcinoma Sólido, anticorpo anti-CD-4. Notar a marcação citoplasmática os linfócitos T. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

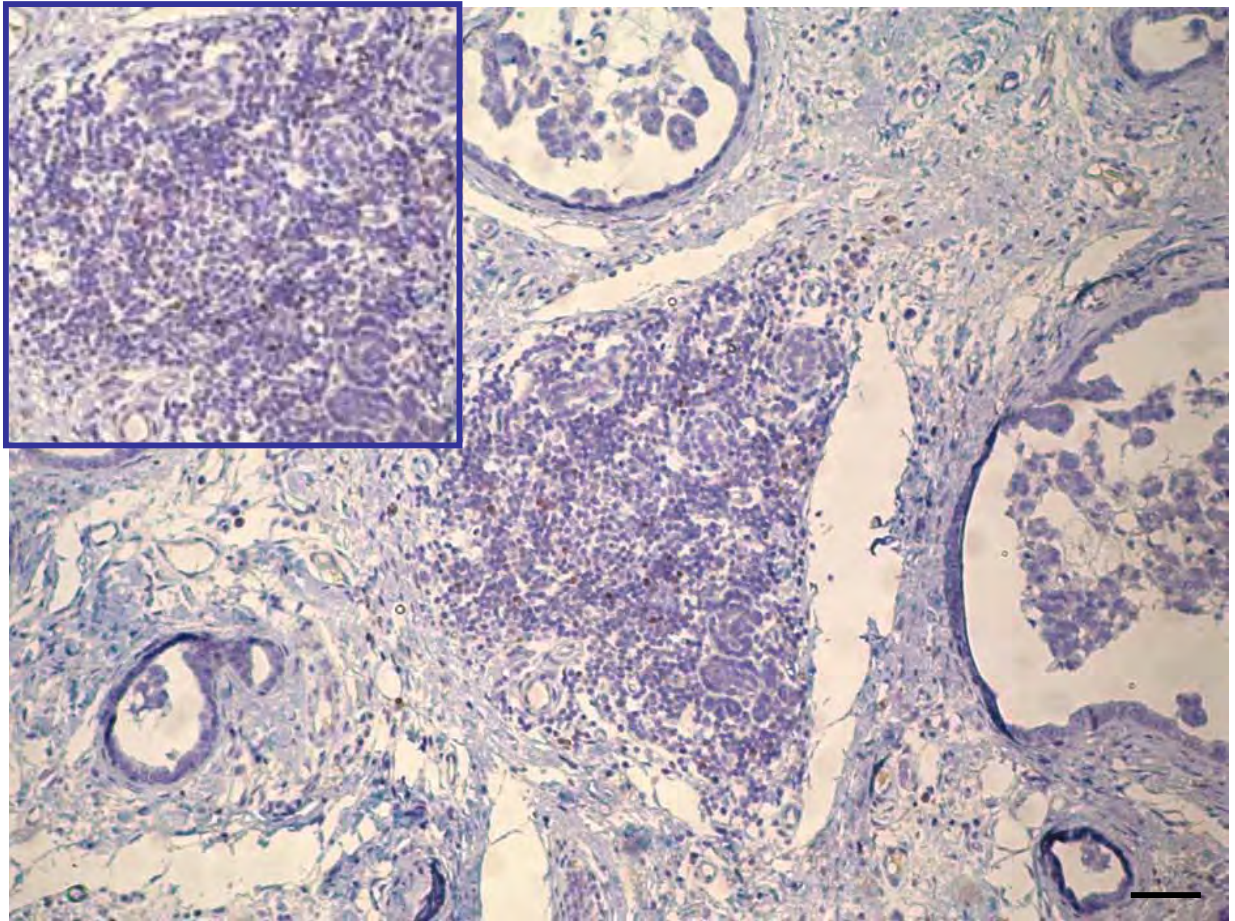


**Figura 23**– Imunomarcção do CD4 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

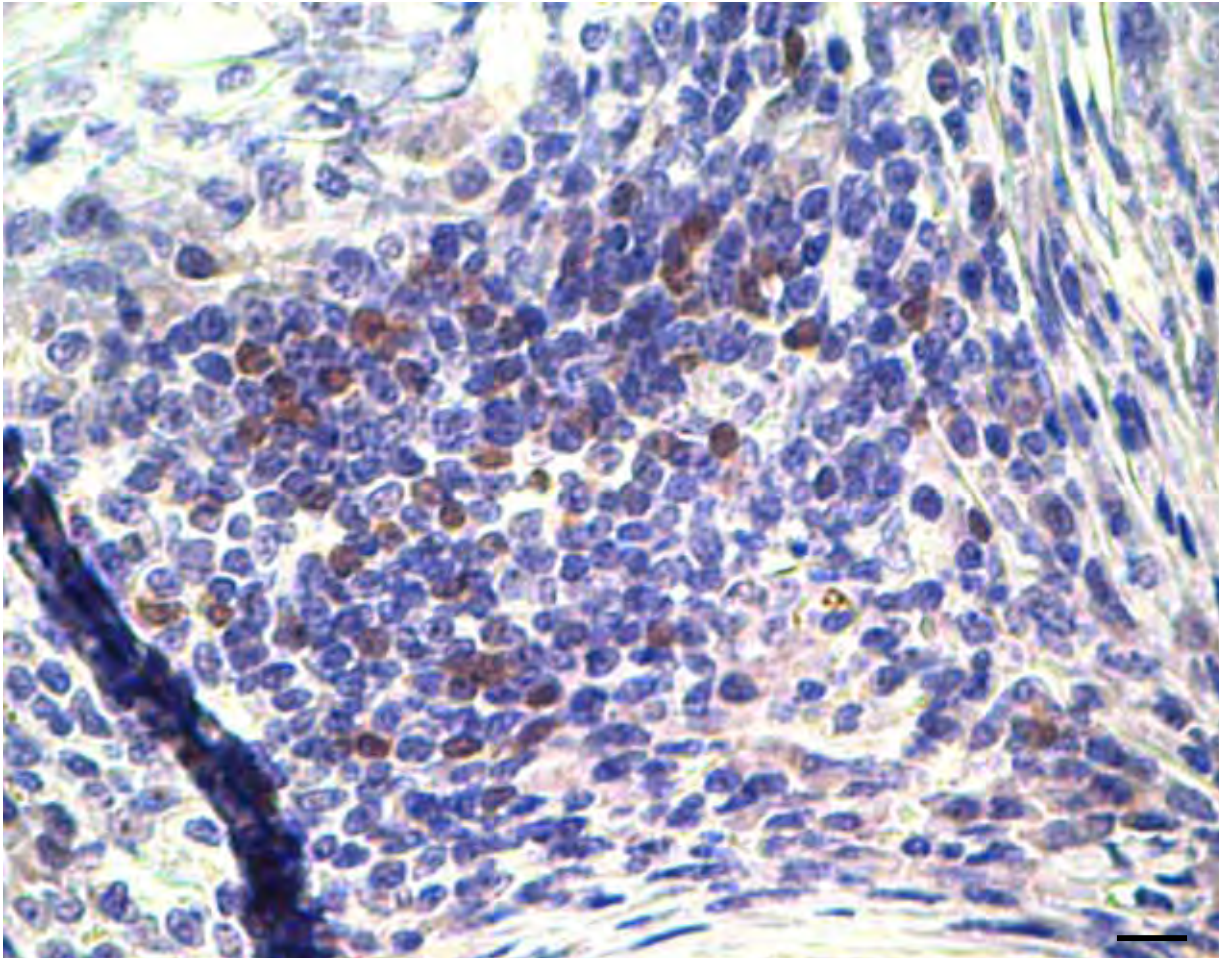
#### IV.1.11 Padrão de imunorreatividade para os Linfócitos T Citotóxicos (CD8)

Os linfócitos T citotóxicos marcados pelo anticorpo anti-CD8 apresentavam um padrão de distribuição e coloração semelhante àquela apresentada pelo anticorpo anti-CD4, os linfócitos reativos estavam localizados no infiltrado inflamatório que circundava o tumor (Figura 24 e 25) e algumas vezes eram vistos espalhados no ambiente tumoral, entremeando as células neoplásicas.

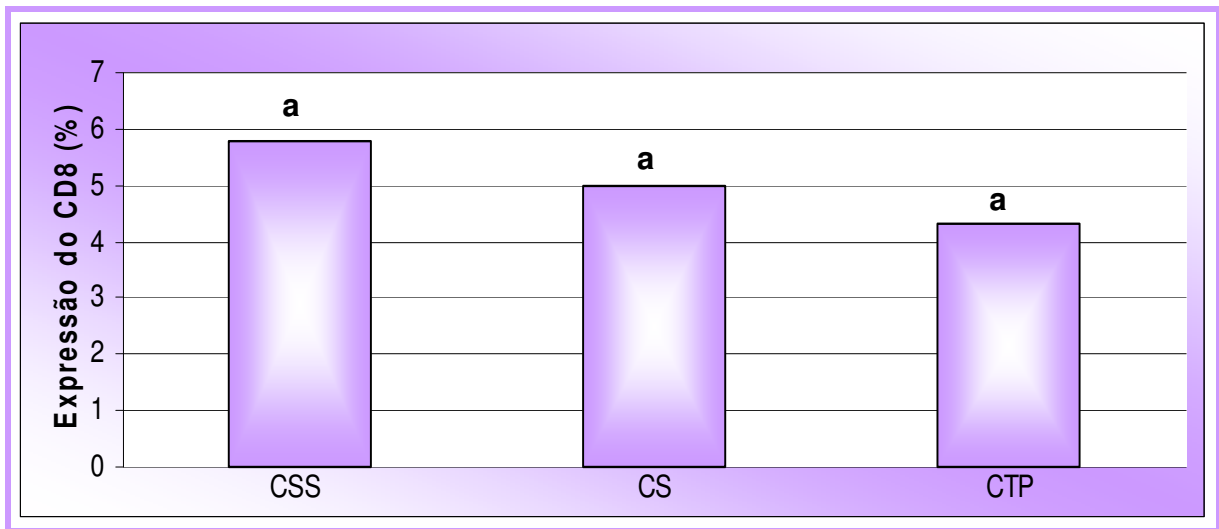
Da mesma forma que o CD3 e o CD4, a imunorreatividade para o CD8 apresentou a seguinte ordem decrescente 5,78% dos linfócitos reativos no carcinosarcoma, 5% nos carcinomas sólidos e apenas 4,30% nos carcinomas tubulopapilares (Figura 26). Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a imunorreatividade dos tumores.



**Figura 24** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinosarcoma, anticorpo anti-CD8. Notar a marcação de linfócito T citotóxicos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).



**Figura 25** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica no carcinoma sólido, anticorpo anti-CD8. Notar os linfócitos T citotóxicos no infiltrado inflamatório. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).

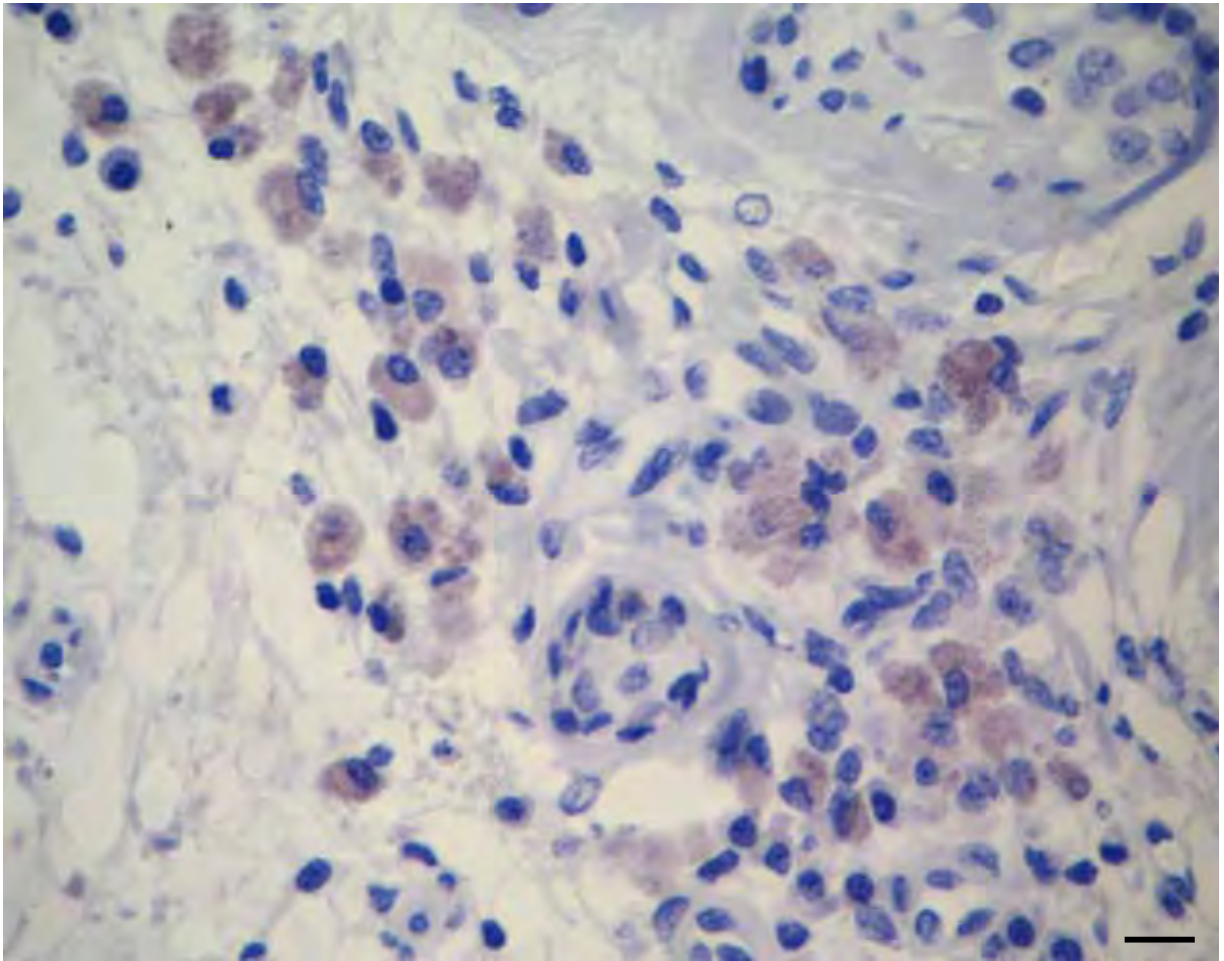


**Figura 26** - Imunomarcção do CD8 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais, não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ).

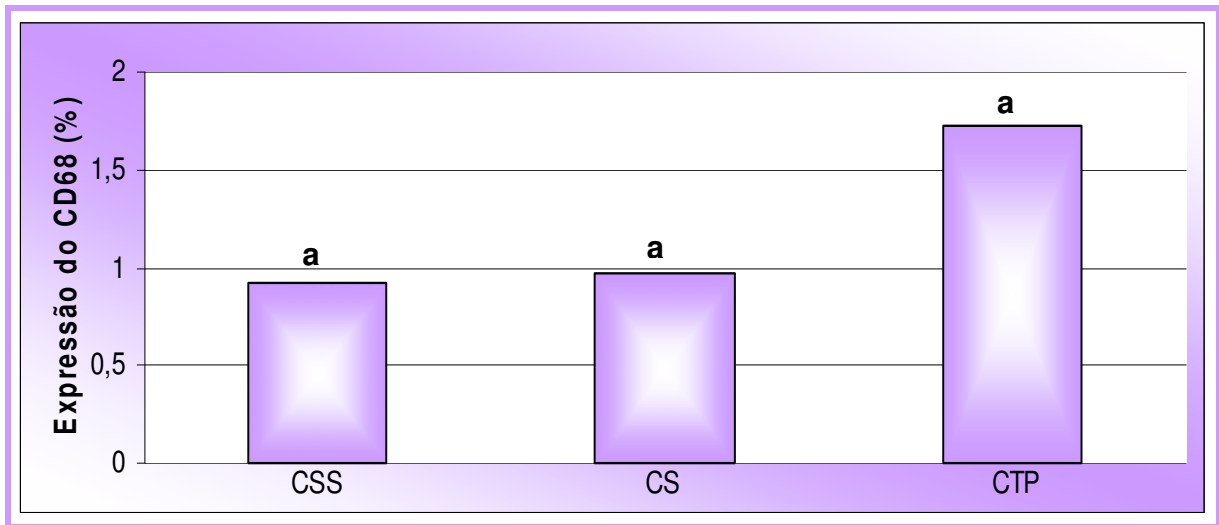
#### IV.1.12 Padrão de imunorreatividade para os Macrófagos (CD-68)

Os macrófagos imunorreativos encontravam-se ao redor do infiltrado inflamatório e caracterizavam-se por uma fraca coloração castanha que preenchia todo o citoplasma (Figura 27).

Foram observados em pequena quantidade em todos os tumores estudados, sendo negativos em alguns casos, a maior concentração de células marcadas foi vista no carcinoma túbulo papilar (1,73%), 0,98% no carcinoma sólido e apenas 0,93% no carcinosarcoma. Nos tumores benignos a concentração de células marcadas foi muito semelhante a encontrada nos malignos, 0,93% nos adenomas e 0,90% no tumor misto benigno (Figura 28). Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre a imunorreatividade dos tumores estudados.



**Figura 27** - Fotomicrografia de preparação imuno-histoquímica em carcinoma tubulopapilar anticorpo anti-CD-68. Macrófagos fracamente marcados localizados no foco inflamatório entre as glândulas mamárias. (Método Estreptoavidina Biotina Peroxidase; Barra = 100um).



**Figura 28** - Imunomarcção do CD68 nas neoplasias mamárias de cadelas. Grupos de tumores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ( $P>0,05$ ).

## V. DISCUSSÃO

Estudos sobre tumores espontâneos de animais domésticos vêm sendo considerados como promissores para o esclarecimento de importantes questões de oncologia, com provável repercussão no estudo das neoplasias de seres humanos. Principalmente nos tumores mamários em cães, pois estes prestam-se como modelos apropriados e, válidos ao estudo da biologia da neoplasia (SCHNEIDER et al., 1969; MOTTOLESE et al., 1994). Também são importantes nos testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos (MacEWEN, 1990, PELETEIRO, 1994).

O aspecto da resposta imune nos tumores mamários caninos malignos, bem como, a presença de alguns marcadores de prognósticos, foram avaliados utilizando-se a imuno-histoquímica. Entretanto, algumas alterações foram feitas visando um melhor resultado das reações. A imuno-histoquímica é um dos métodos de diagnóstico empregados no estudo de muitas patologias, dentre elas as neoplasias, sendo útil para se estabelecer à classificação, a identificação e o prognóstico dos tumores (TAYLOR & COTE, 1994), além de ser usado como um método essencialmente quantitativo, menos sujeito a erros, na determinação de células mononucleares infiltradas nos tumores (PRALL et al., 2004).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais facilitou a identificação de marcadores ou produtos celulares, podendo-se determinar a presença de antígenos relacionados a tipos específicos de tecido (WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998). A marcação de células por anticorpos específicos pode ser realizada tanto em cortes de congelação como em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. Vários estudos mostram que anticorpos contra antígenos humanos, disponíveis comercialmente, podem ser usados para o reconhecimento de epitopos em tumores de cães e gatos (MOORE et al., 1989; DESNOYERS et al., 1990; THOOLEN et al., 1992; WILLIAMSON & MIDDLETON, 1998).

O presente estudo foi composto por dois aspectos, por um lado o papel de marcadores de prognóstico nos tumores mamários malignos e por outro, o papel do infiltrado inflamatório nesses mesmos tumores. Portanto, o capítulo foi dividido didaticamente em duas partes.

### **Marcadores de Prognóstico**

Como já registrado anteriormente, tumores mamários são muito comuns em fêmeas caninas não castradas. De acordo com o diagnóstico histológico, entre 41 e 53% dos tumores mamários que acometem cadelas são malignos (MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001). Entretanto, evidência histológica de malignidade, não implica invariavelmente em curso clínico maligno. Por essa razão, fatores de prognóstico são de ótima importância para estimar o risco individual de resultados clínicos desfavoráveis. Alguns são reconhecidos como fatores de prognóstico bem aceitos nos tumores mamários malignos de cães são o tamanho do tumor, estado do linfonodo, metástases distantes, tipo histológico, grau de malignidade histológica e grau de diferenciação celular (MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001).

Nos últimos anos, muito esforço tem sido feito para encontrar correlações entre estágio clínico e prognóstico clínico (FOWLER et al., 1974; HAMPE & MISDORP, 1974, BOSTOCK, 1975; MISDORP & HART, 1976; GILBERTSON et al., 1983; BENJAMIN et al., 1999). Essa correlação vem sendo analisada através da avaliação da proliferação celular (Ki-67) (SARLI et al., 2002; ZACCHETTI et al., 2003; YANG et al., 2006), expressão de receptores hormonais (NIETO et al., 2000; MARTIN DE LAS MULAS et al., 2005; MILLANTA et al., 2005) e expressão aberrante da proteína supressora p53 (GAMBLIN et al., 1997; RUNGSIPIPAT et al., 1999; LEE et al., 2004).

Os resultados encontrados, no presente experimento, evidenciam a importância do estudo de marcadores celulares nas neoplasias mamárias pela técnica de imunohistoquímica, semelhante ao relatado por ZUCCARI (2001), pois foi possível determinar a presença, bem como quantificar a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona, Ki-67 e p53.

Em humanos, a etiologia do câncer de mama é multifatorial e inclui fatores como predisposição genética, idade na primeira gravidez, primeira menstruação e atividade dos receptores hormonais no tecido mamário (HASLAM & SHYAMALA, 1979; ZEIMET et al., 1994). Progesterona e estrógeno têm papel crucial no controle da proliferação da glândula mamária e formação do tumor (ELLING & UNGEMACH, 1983; NICHOLSON et al., 1991). O efeito fisiológico desses hormônios é mediado principalmente por receptores expressos no tecido mamário (MOL et al., 1999).

A presença de receptores de estrógeno e progesterona em proporções variáveis nos tumores mamários malignos e benignos de cães tem sido demonstrado por métodos bioquímicos e imunoistoquímicos (GRAHAM & MYERS, 1999; GERALDES et al., 2000; NIETO et al., 2000; RUTTEMAN et al., 2001; SOBCZAK-FILIPIAK et al., 2002).

Verificou-se por meio dos resultados que a imunomarcagem do ER estava localizada no núcleo de células epiteliais normais, benignas e malignas e também nas células mioepiteliais. Mínima marcação citoplasmática foi observada. Células neoplásicas presentes no estroma normal, células cartilaginosa e ósseas dos carcinossarcomas não apresentaram marcação, coincidindo com os achados de NIETO et al., (2000). Houve uma heterogenicidade na intensidade de coloração desses receptores, resultado similar ao encontrado no câncer de mama da mulher (PASCAL et al., 1983; TOSI et al., 1987; RAYMOND & LEONG, 1989; RUTTEMAN, 1990), esse fato pode ser atribuído a diferenças na atividade celular.

Com relação a concentração desse receptor, ela foi maior no carcinossarcoma, seguido pelo carcinoma sólido e depois pelo tubulopapilar, semelhantemente ao demonstrado por YANG et al., 2006. Com esses achados podemos sugerir que os níveis de ER podem ser relacionados com a histopatologia do tumor, já que houve diferença significativa entre os três tipos de tumores analisados. Infelizmente nós não associamos nenhuma variável clínica, histológica ou epidemiológica com a presença desse marcador, o que poderia contribuir de certa forma com esses achados. Por exemplo, idade, tamanho do tumor, ulceração da pele e estágio clínico, quatro importantes fatores no tumor de mama canino que foram associados com níveis de ER

(RUTTEMAN et al., 1988; SARTIN et al., 1992; HELLMÉN, 1993; PÉREZ-ALENZA et al., 1997; PEÑA et al., 1998).

Pacientes com câncer de mama, que apresentam níveis de ER elevado, tem maior sobrevida e melhor resposta ao tratamento hormonal que pacientes que não apresentam ER (COCKER et al., 1969; PICHON et al., 1980). Entretanto, não se pode afirmar o mesmo para os tumores mamários caninos analisados, pois infelizmente não temos o acompanhamento dos cães portadores desses tumores.

Os receptores de progesterona também estavam localizados no núcleo de células epiteliais neoplásicas e normais nos três tipos de tumores malignos analisados, resultado semelhante ao encontrado por MARTÍN DE LAS MULAS et al., 2005. Entretanto, foi observada intensa marcação citoplasmática das células epiteliais neoplásicas, as quais apresentavam maior concentração no carcinoma sólido, seguido pelo tubulopapilar e carcinossarcoma, no qual estavam em menor quantidade. Segundo alguns autores, o receptor de progesterona pode ser encontrado de várias formas e quando estes estão presentes no citoplasma, isso pode ser atribuído a um distúrbio no transporte nuclear do receptor, significando uma inatividade desses tumores (LANTINGA-VAN LEEUWEN et al., 2000; LEE et al., 2006). Pode-se sugerir que a diferença significativa observada entre o carcinoma sólido e os outros dois tipos de tumores seja devido a um maior número de casos desse tumor com maior grau de malignidade, apesar desse aspecto infelizmente não ter sido avaliado. Já que é sabido que tumores benignos têm elevado número de células progesterona positivas, enquanto tumores malignos tem fenótipo inverso (GERALDES et al., 2000; THURÓCZY et al., 2007).

Os receptores hormonais ER e PR tiveram expressão similar nos 3 tipos tumorais, com destaque para o carcinossarcoma que teve uma tendência em apresentar a maior concentração de ambos. Isso fortalece o fato da maior concentração de receptores hormonais em neoplasias menos agressivas.

O estudo de parâmetros que refletem as fases do ciclo celular de células neoplásicas tem mostrado ser útil na avaliação do comportamento biológico de tumores (O'REILLY & RICHARDS, 1992). Uma variedade de métodos têm sido introduzidos

nessa área de pesquisa, mas somente alguns deles são aplicáveis em tecidos embebidos em parafina e fixados em formol. Devido a isso, a estimação da fração de crescimento foi analisada em nosso estudo por meio da demonstração imunohistológica do então chamado índice de proliferação celular (Ki-67).

Ki-67 é uma proteína não histona que expressa seu pico durante as fases G2/M do ciclo celular, só aparece no núcleo de células que sabiamente estão ciclando, células quiescentes são consistentemente negativas (GERDES & ZENTGRAF, 1998), portanto aparece em níveis elevados em tumores com alta proliferação celular.

Os resultados mostram uma maior concentração de Ki-67, nos carcinomas tipo sólido, seguida pelo tubulopapilar e uma menor concentração no carcinosarcoma, havendo diferença significativa do sólido em relação aos outros dois, levando-nos a pensar que o carcinoma sólido apresentava uma maior proliferação celular. A imunorreatividade em células não mitóticas era restrita ao núcleo, mas em células mitóticas a marcação se dava nos cromossomos, corroborando com os achados de PEÑA et al. (1998), observamos também alguns nucléolos marcados.

Analisando os tumores, pode-se dizer que houve correlação inversa nos níveis de Ki-67, ER e PR, ou seja, quando a proliferação celular aumentava o número de ER e PR diminuía. Estudos recentes revelaram que o índice de proliferação celular e o índice de ER foram significativamente correlacionados no tumor de mama canino (PEÑA et al., 1998; NIETO et al., 2000). Esses resultados estão de acordo com os achados no câncer de mama humano (WINTZER et al., 1991; HURLIMANN et al., 1993; RUDAS et al., 1994), indicando que tumores bem diferenciados mantêm algum mecanismo hormonal regulatório e são associados a baixo grau de proliferação celular. A falha de correlação entre Ki-67 e o receptores hormonais em alguns casos pode se associada com maior número de células em fase G0 do ciclo celular, as quais são negativas para o KI-67.

A imunomarcação da p53 no presente trabalho, foi predominantemente nuclear, havendo em algumas células imunorreatividade citoplasmática. Observou-se expressão da proteína p53 em todos os casos estudados. Provavelmente a utilização do anticorpo policlonal p53 conferiu maior expressão e menor especificidade, justificando a

marcação de todos os tumores analisados, corroborando com os achados de ZUCCARI et al. (2005).

Presente nas células normais na forma “wild” ou não-mutante, o gene p53 tem a função de bloquear a divisão celular através de uma proteína por ele produzida, atuando como mediador da apoptose quando da ocorrência de alterações no genoma (LOWE et al., 1994). Quando este gene torna-se mutante, ocorre perda do controle do ciclo celular e, como consequência, pode ser observado distúrbios na indução da apoptose (MAY e MAY, 1999). Houve diferença significativa entre o carcinosarcoma e os dois carcinomas simples, com maior expressão da proteína p53 nos carcinomas simples, podendo-se sugerir que o carcinosarcoma apresentou menor concentração de mutações que os demais tumores. É interessante ressaltar, que se observou uma maior expressão da p53 nos mesmos tipos de tumores em que houve maior expressão do Ki-67, ou seja no carcinoma sólido e no tubulopapilar, o que leva a pensar em uma correlação da mutação celular com o índice de proliferação celular, corroborando com os achados de Lee et al. (2004). Como esses dois tumores são os tipos mais agressivos, talvez pudessem ser usados como marcadores de prognóstico.

Mutações no gene p53 têm sido associadas com o desenvolvimento de neoplasia mamária humana e canina, pacientes com câncer de mama com alterações do gene p53 são considerados de pior prognóstico. Entretanto, significado prognóstico de mutações no gene p53 em cães não é claro. No nosso estudo, não foi possível relacionar a expressão da p53 com a sobrevida dos cães, porque infelizmente o acompanhamento dos pacientes não é tão fácil como na medicina humana e também devido à variedade de tratamentos.

### **Infiltrado inflamatório associado às neoplasias mamárias caninas**

A imunopatologia de tumores humanos e de animais há muitos anos tem sido tema de inúmeros trabalhos, particularmente daqueles que envolvem a intrigante relação tumor-hospedeiro. A interação tumor-hospedeiro pode ter um papel importante na determinação da progressão do tumor ou até mesmo na sua remissão. Recentes

estudos têm demonstrado que essa interação pode ser influenciada pela liberação de fatores solúveis pelas células tumorais e por linfócitos infiltrados no tumor (CHOUAB et al., 1997; TROJAN et al., 2004).

Durante muito tempo, postulou-se que o sistema imune era capaz de reconhecer e destruir células tumorais. O conceito de BURNETT & THOMAS (1959) era de que o sistema imune manteria uma vigilância contínua do organismo para a presença de células anormais, que uma vez reconhecidas como tais, seriam destruídas. A resposta imune a um tumor, portanto era considerada um evento inicial, que levaria à destruição da maioria dos tumores antes que eles tivessem um significado clínico aparente. Também foi proposto que o sistema imune teria um papel importante no retardo do crescimento ou na regressão de tumores (ROITT et al., 2003).

No presente estudo, utilizou-se o método imuno-histoquímico para avaliar a resposta imune nos tumores mamários malignos de cadelas (carcinosarcoma, carcinoma sólido e carcinoma tubulopapilar). Avaliamos o infiltrado inflamatório através de marcadores de linfócitos T (CD3, CD4, CD8), linfócitos B (CD79- $\alpha$ ), macrófagos (CD68), complexo de histocompatibilidade maior (MHC II) e também analisamos a presença das citocinas TGF- $\beta$  e o receptor de IL-2.

Ainda que a resposta imune possa barrar o crescimento das neoplasias mamárias, não proporciona sua completa destruição, por diferentes motivos: debilidade desta, existência de linfócitos T supressores, anticorpos ou imunocomplexos que bloqueiam as células efectoras ou incapacidade para reconhecer antígenos tumorais (BHAN & DESMARAIS, 1983). Além disso, a resposta inflamatória local pode falhar na prevenção de crescimento das neoplasias por várias razões: as células tumorais derivam-se de células normais do hospedeiro, o que em muitas ocasiões dá lugar a uma débil ou apenas detectável resposta imunológica; a capacidade de resposta do sistema imune pode ser superada pelo crescimento do tumor; muitas neoplasias apresentam mecanismos especializados para evadir as respostas imunológicas do hospedeiro (ABBAS et al., 2004). Por outro lado, não está claro se a infiltração inflamatória é conseqüência de uma resposta antitumoral ou uma reação induzida pela

liberação do fator de necrose tumoral ou de citocinas secretadas pelas células tumorais (PUPA et al., 1996).

Deve-se destacar a escassa bibliografia em medicina humana, sobre a caracterização e o papel do infiltrado inflamatório no câncer de mama. Os poucos trabalhos publicados existentes se limitam ao estudo das subpopulações linfocitárias CD4 e CD8 e a maioria em suspensões celulares. Por outro lado, a bibliografia é praticamente inexistente em Medicina Veterinária, não havendo até o momento nenhum trabalho publicado a respeito das neoplasias mamárias caninas.

É difícil estabelecer um padrão de resposta imune local para cada tipo de tumor mamário canino, pois existem variações entre os diferentes tipos histológicos, o que também é demonstrado no câncer de mama da mulher (BRODEY et al., 1983). Essa variabilidade na composição do TILs pode dever-se a interação tumor-hospedeiro. Experimentos em tumores no homem sugerem que as interações entre as células do tumor e as do hospedeiro podem ter efeitos estimulatórios e inibitórios na imunidade antitumor, em decorrência da composição celular heterogênea das células infiltradas e das suas diferentes interações com as células do tumor (TSUKAMOTO et al., 1992; O'SULLIVAN; LEWIS, 1994; YANASE et al., 1995, LUSTER, 2002).

Na glândula mamária normal, a presença de infiltrado inflamatório é escassa e está constituída principalmente por linfócitos e alguns macrófagos. As células apresentadoras de antígenos, MHC II aparecem no estroma, sendo em sua maioria macrófagos e fibroblastos, além do que esta molécula também tem sido expressa por algumas células mioepiteliais e epiteliais (DEL CASTILLO, 2002).

Estes resultados variam quando se contemplam tumores mamários malignos. Segundo DEL CASTILLO (2002), em geral as cadelas que somente apresentam neoplasias malignas e nenhuma benigna, se caracterizam por apresentar um infiltrado inflamatório muito mais intenso, porém, os animais com mais de três tumores benignos (independente da existência ou não de neoplasias malignas) apresentam valores mais baixos de inflamação. Talvez esse fato se deva a uma falta de reação do sistema imune do hospedeiro ao tumor mamário, deixando de reconhecê-lo como algo estranho ao organismo e diminuindo a resposta imune local. A falta de resposta frente a um

antígeno pode dever-se a um processo de tolerância imunológica (os linfócitos se inativam ou são eliminados) ou o antígeno é ignorado, além disso, a estimulação dos linfócitos de forma repetida dá lugar a morte das células ativadas mediante processo de apoptose (ABBAS et al., 2004).

A expressão do MHC II foi mais evidente no tipo carcinossarcoma, que seria o tipo histológico menos agressivo. Da mesma forma a marcação de CD3, CD8 e CD4, embora sem diferença estatística entre os grupos, teve uma tendência a ter a maior média em carcinossarcoma. Talvez neste tipo tumoral a capacidade de apresentar antígenos das células tumorais e adjacentes ainda esteja mantida e seja perdida nos tipos mais agressivos.

A expressão do MHC II por parte das células neoplásicas epiteliais sugere, que elas atuem como APC que estimulariam corretamente os linfócitos CD4<sup>+</sup>, mas que, porém não conseguem precipitar a atividade citotóxica característica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (as citocinas secretadas pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> atuam sobre as células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos, granulócitos e endotélio vascular (ABBAS et al., 2004). Segundo PÉREZ et al. (1999) a expressão desta molécula por parte das células neoplásicas não é mais que um intento de melhorar a resposta imune, entretanto, como vimos no presente trabalho não existe relação entre os níveis de células com o MHC II e as porcentagens de células T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, que se encontravam em proporções bem mais baixas que o MHC II.

Em melanomas, essa molécula está associada à ocorrência de metástases (D'ALESSANDRO et al., 1987), enquanto que em tumores de glândula mamária da mulher a presença dessa molécula está relacionada a um prognóstico favorável (NATALI et al., 1993). A menor expressão do MHC II em linfócitos e células neoplásicas do câncer de mama humano favorece seu escape do sistema imune (HADDEN, 1999). WARABI et al., (2000) observaram uma maior expressão do MHC II nas células neoplásicas dos tumores colorretais bem diferenciados que nos pouco diferenciados.

Como já comentado anteriormente, citocinas presentes no ambiente tumoral podem afetar o crescimento e a sobrevivência do tumor. A interleucina-2 é uma citocina linfocitotrófica envolvida no crescimento e diferenciação de células T e B, que aumenta

a função citolítica das células natural killer; e também conhecida por ter função na proliferação de algumas células não linfóides (MINAMI et al., 1993; WITHESSIDE & HERBERMAN, 1995). O aumento na expressão da IL-2 e IL-2r tem sido reportado em tumores em atividade proliferativa como tumores de estômago, renal, carcinoma espinocelular (LIN et al., 1995), melanomas, neuroblastoma (RIDINGS et al., 1995) carcinoma de células escamosas (REICHERT et al., 1998) e câncer de próstata (ROYUELA et al., 2000). Nos caso de câncer de estomago, renal, carcinoma espinocelular , a IL-2 tem sido vista estimulando a proliferação celular e aparece de maneira mais abundante nas células em mitose do que nas células que estão em outra fase do ciclo celular (LIN et al., 1995; REICHERT et al., 1998).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram a presença de receptores da IL-2 nos 3 tipos de tumores analisados, a imunomarcção aparecia no citoplasma de células epiteliais tanto normais quanto neoplásicas e também nos linfócitos, e algumas vezes essa marcação era tanto na superfície celular como no citoplasma semelhante ao relatado por GARCIA-TUÑON et al., 2003. Segundo GARCIA-TUÑON et al. (2003), há uma maior presença desse IL-2r em lesões mamárias malignas do que em benignas. Para esses autores, a elevada expressão de IL-2 e de IL-2r nas células de câncer de mama podem contribuir para o desenvolvimento do tumor por aumentar a proliferação celular e inibir a apoptose.

Apesar de estudos imuno-histoquímicos não fornecerem informações sobre a função dessa molécula, o presente trabalho sugere que o desenvolvimento do tumor mamário em cães pode estar associado com o aumento da IL-2, já que a maior detecção desse receptor foi vista no carcinoma sólido, ou seja, no mesmo tipo que apresentou maior índice de proliferação celular.

O TGF- $\beta$  também é uma citocina que está presente no ambiente tumoral, também produzida pelas células tumorais (PARDOLL, 2002; GROH et al., 2002) e também pelas células Treg (LEVINGS & RONCAROLO, 2000). O TGF- $\beta$  é um potente inibidor da resposta imune, proporcionando o escape à vigilância imunológica (ROITT et al., 2003). No presente trabalho os tumores carcinoma sólido e carcinoma tiveram maior imunomarcção de TGF- $\beta$  e CD79- $\alpha$ , esse fato confirma que nos tumores mais

agressivos existe uma predominância de uma resposta do tipo Th2 com imunidade humoral associada, portanto não adequada para destruir células tumorais. Pode-se sugerir que esse padrão de resposta imune seria um mecanismo de evasão imune do tumor.

Alguns estudos têm mostrado que TILs isolados de tumores parecem estar imunologicamente inertes ou suprimidos (WITHESSIDE et al., 1986; RABINOWICH et al., 1987), contudo esses TILs podem ser estimulados *in vitro* por alguns fatores, passando a exercer novamente sua atividade citolítica contra os tumores (HALAK et al., 1999). Isso sugere que fatores internos do microambiente tumoral são responsáveis pela impotência imunológica observada nos TILs isolados de tumores. O que se pôde observar no presente experimento é que, a concentração dessa citocina aumentava nos tumores malignos, podendo sugerir que ela estaria inibindo a proliferação das células T e B, habilitando o tumor a escapar da resposta imune, coincidindo com o achado de HSIAO et al. (2004) no tumor venéreo canino.

Neste estudo, os linfócitos B estavam presentes em todos os tumores mamários caninos. Estudo realizado por BALCH et al. (1990), mostra que 20% dos carcinomas mamários humanos apresentam células B formando parte do infiltrado inflamatório. E DEL CASTILLO (2002) observou que cerca de 65,1% das neoplasias mamárias caninas malignas analisadas apresentavam linfócitos B em seu infiltrado.

Os linfócitos B no presente trabalho alcançaram sua maior representação no carcinoma sólido, seguido pelo carcinoma tubulopapilar e se apresentaram de maneira discreta no carcinosarcoma, achado semelhante ao observado por DEL CASTILLO (2002), que encontrou maior concentração de linfócitos B no carcinoma sólido e ausência destas células no carcinosarcoma. Apresentavam-se formando agregados linfóides ou pseudofolículos associados ao componente epitelial ou aos vasos, igual ao observado no câncer de mama por GREKOU et al. (1996).

Não há muito descrito na literatura sobre a relevância destas células na resposta imune local das neoplasias mamárias, além de existir pouca evidência da efetividade da imunidade humoral em relação aos tumores (ABBAS et al., 2004). A presença de linfócitos B, nas neoplasias benignas e malignas nos leva a pensar na existência de

uma resposta humoral e não somente celular frente aos tumores. Entretanto, também se associa a existência dessas células com um prognóstico negativo já que a resposta Th2 inibe a resposta Th1 responsável pelo controle da proliferação tumoral (DEL CASTILLO, 2002).

Com relação aos linfócitos T, pouco se sabe sobre o seu papel no ambiente tumoral, entretanto ficou demonstrado que sua presença não é efetiva na hora de deter a progressão tumoral ou prevenir a aparição de recidivas ou metástases coincidindo com os achados de MARSIGLIANTE et al. (1999) e VGENOPOULOU et al. (2003) no carcinoma de mama da mulher.

Em todos os casos estudados no presente trabalho, observou-se que as células T são o componente inflamatório principal do infiltrado linfocitário, resultados que coincidem com estudos realizados em medicina humana (O'SULLIVAN & LEWIS, 1994; GREKOU et al., 1996). Dentro dos linfócitos T, a subpopulação predominante em todos os casos foi o fenótipo CD4<sup>+</sup>, igual ao observado no câncer de mama da mulher (BALCH et al., 1990; HADDEN, 1999). Segundo DEL CASTILLO (2002), nos casos de neoplasias mamárias de alta malignidade histológica, a subpopulação de células CD8<sup>+</sup> supera a de células CD4<sup>+</sup>, fato que também é observado no tumor de mama na medicina humana (BHAN & DESMARAIS, 1983; NAUKKARINEN & SYRJANEN, 1990; GEORGIANNOS et al., 2003; SHEU et al., 2008). DEL CASTILLO (2002) também observou que há uma descendência no número de linfócitos T infiltrados nos casos de tumores de grau histológico mais avançado. Entretanto, o mesmo não foi visto no nosso trabalho, tanto no que se refere ao número de linfócitos infiltrados como no aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, talvez isso se dê pelo fato de não termos separado os tumores pelos graus de malignidade histológica, o que pode ser feito em trabalhos futuros.

A maior concentração de células T CD4<sup>+</sup> em detrimento as células T CD8<sup>+</sup>, em nosso estudo, poderia estar relacionada com uma pobre diferenciação tumoral, já que este achado se observa em tumores mamários caninos de alta malignidade. Esse achado também foi observado por CHIN et al. (1993) no câncer de mama da mulher. Para estes autores, uma diminuição no número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em neoplasias de grande tamanho pode refletir em deficiência local na reação citolítica frente às células

tumorais, e um aumento da subpopulação CD4<sup>+</sup> em neoplasias pouco diferenciadas, pode gerar progressão do tumor.

Muitos tumores, como já descrito anteriormente, não são rejeitados apesar de serem reconhecidos por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (BOON & VAN DER BRUGGEN, 1996; ROSENBERG, 1999). O mecanismo que inibe a rejeição dos tumores incluem aqueles mediados pelo próprio tumor, como produção de TGF- $\beta$  derivado do tumor ou moléculas solúveis relacionadas ao MHC I (PARDOLL, 2002; GROH et al., 2002). O estroma do tumor também pode impedir o fornecimento e expansão de células T eficientes tanto nos linfonodos de drenagem (GROH et al., 2002) como nos locais do tumor (YU et al., 2004). A ausência de rejeição imune-mediada ao tumor também induz inadequada resposta de células T do hospedeiro, que pode ser devido a anergia dessas células, deleção (KURTS et al., 1997; BOURGEOIS et al., 2002), e inibição da resposta das células T por citocinas supressoras como a IL-10. Estudos recentes revelam o potencial papel das células T regulatórias no controle da resposta imune ao tumor. Esse tipo de célula, as quais expressam o fenótipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, tem sido estabelecido como um potente regulador das células T na imunidade órgão específica e nas doenças crônicas (MALOY & POWRIE, 2001; BELKAID et al., 2002; SHEVACH, 2001; SAKAGUSHI et al., 2001).

De qualquer maneira, ainda não se sabe o mecanismo pelo qual as células Treg medeiam sua função supressora. Estudos recentes demonstram que essas células têm efeito direto na função das células T CD8<sup>+</sup>, suprimindo a liberação de grânulos citotóxicos (MEMPEL et al., 2006). Entretanto, as células Treg têm mostrado um potente efeito supressivo na resposta de células T CD4<sup>+</sup>, demonstrando assim que elas podem agir de várias maneiras, dependendo das diferenças nos modelos experimentais (CHAPUT et al., 2007).

Dos achados do presente trabalho pode-se sugerir que as células T presentes no infiltrado inflamatório das neoplasias malignas poderiam ser em sua maioria células T CD4<sup>+</sup> regulatórias, as quais estariam inibindo a função citotóxica das células T CD8<sup>+</sup>, causando a progressão do tumor. Seria interessante que em trabalhos futuros fossem

analisados os fenótipos das células T CD4<sup>+</sup> presentes no infiltrado, podendo assim classificá-las em efectoras ou supressor.

Os macrófagos são células freqüentemente encontradas no microambiente de tumores e evidências indicam que, quando ativados, são capazes de reconhecer e lisar células tumorais, incluindo aquelas que são resistentes a drogas citostáticas (KLIMP et al., 2002). Essas células parecem ter um papel controverso na imunidade tumoral. Eles podem ter ação positiva ou negativa no sistema imune (ELGERT et al., 1998). Embora suas ações antitumorais estejam amplamente documentadas (ADAMS & HAMILTON, 1984; VAN RAVENSWAAY CLAASEN et al., 1992; GORDON et al., 1995), macrófagos imunorregulatórios podem inibir as respostas de células T e alterar suas funções tumoricidas, quando associados a tumores (ALLEVA et al., 1994). ELGERT et al. (1998) verificaram que os tumores têm a capacidade de produzir citocinas e substâncias pró e anti-inflamatórias que subvertem os macrófagos, funcionando como mecanismos de evasão dos tumores.

No presente trabalho, os macrófagos foram encontrados em pequena quantidade nos três tumores mamários malignos, não havendo diferença significativa entre eles. Em alguns casos essas células estavam ausentes no infiltrado inflamatório. Estes resultados coincidem com os achados de CHANDLER & YANG (1981), que observaram um pequeno número de macrófagos no infiltrado inflamatório de TVT. Entretanto, não se pode afirmar que essas células realmente estejam quase ausentes nos tumores mamários caninos, novos estudos utilizando outros marcadores de macrófagos são necessários para confirmar este achado.

Para finalizar está discussão pode-se dizer que as causas das falhas na intenção por parte do hospedeiro de conter as neoplasias são desconhecidas até o momento, entretanto é possível que em um futuro não muito distante as investigações sobre a secreção e atividades dos diferentes tipos de citocinas que modulam a resposta imunitária local, bem como a função e ação das células regulatórias no tumor possam esclarecer de certa forma, onde e porque há essa falha do sistema imunitário do hospedeiro.

## VI. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- O método de imuno-histoquímica mostrou-se adequado para a caracterização do infiltrado inflamatório e também para a avaliação dos marcadores de prognóstico;
- A imunomarcção de receptores hormonais diminui com a malignidade;
- Houve correlação entre o índice de proliferação celular e mutação no carcinoma sólido e tubulopapilar e menor infiltrado de T CD4 e T CD8;
- Houve correlação negativa entre o p53 e o ki-67 e os receptores de progesterona e estrógeno;
- Houve maior concentração de MHC II no carcinossarcoma, podendo indicar um mecanismo de evasão celular;
- Houve maior concentração de IL-2 e Ki-67 no carcinoma sólido podendo-se associar essa citocina com a proliferação celular;
- Houve associação entre TGF- $\beta$  e a presença de linfócitos B nos tipos tumorais carcinoma sólido e tubulopapilar, caracterizando evasão imune;

## VII. REFERÊNCIAS

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

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, p. 1629 -1633, 1999.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 283-318, 1984.

AHMADZADEH, M.; ROSENBERG, S. A. IL-2 administration increases CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. **Blood**, v. 107, p. 2409-2414, 2006.

ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Increased sensitivity of tumor-bearing host macrophages to interleukin-10: a counter-balancing action to macrophage-mediated suppression. **Oncology Research**, v. 6, p. 219-228, 1994.

ANDERSON, A. C. Parameters of mammary gland tumors in aging beagles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 147, p. 1653, 1965.

AWWAD, M.; NORTH, R. J. Immunologically mediated regression of a murine lymphoma after treatment with anti-L3T4 antibody. A consequence of removing L3T4+ suppressor T cell from a host generating predominantly Lyt-2+ T cell-mediated immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 2193-2206, 1988.

BALCH, C. M.; RILEY, L. B.; BAE, Y. J. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. **Arch Surgical**, v.125, p.200-205, 1990.

BARBOSA, T. V.; ROSAS, M. P.; COSTA, A. C.; RAPOPORT, A. Valor prognóstico do KI-97 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior : estudo de 11 casos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 629-634, 2003.

BEATTY, G. L.; PATERSON, Y. IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system *in vivo* by downregulation cellular levels of an endogenous tumor antigen. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 5502-5508, 2000.

BECK-ENGESER, G. B.; MONACH, P. A.; MUMBERG, D. Point mutation in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, p. 285-300, 2001.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

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.

BERENDT M. J.; NORTH, R. J. T cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of a immunogenic tumor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 151, p. 69-80, 1980.

BERGH, J.; NORBERG, T.; SJOGREN, S.; LINDGREN, A.; HOLMBERG, L.; COPLETE, J. Sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 1, p. 1029-1034, 1995.

BERTINETTI, C.; KOZINER, B. Aplicación clínica de células dendríticas en oncología. Disponível em:<<http://www.aaoc.org.ar/aaocweb/revista/noviem2000/Dendríticas.htm>>. Acesso em 30 set. 2002.

BHAN, A. K.; DESMARAIS, C. L. Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. **Journal National Cancer Institute**, v. 68, p.445-447, 1983.

BLATTMAN JN, GREENBERG PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. **Science**, v. 9, p. 200-205, 2004.

BOON, T.; VAN DER BRUGGEN, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.183, p.725-729, 1996.

BOSTOCK, D.E. The prognosis following the surgical excision of canine mammary neoplasms. **European Journal of Cancer**, v. 11, p. 389-396, 1975.

BOSTOCK, D. E. Canine and feline mammary neoplasms. **British Veterinary Journal**, v. 142, p. 506-515, 1986.

BOURGEOIS, C.; VEIGA-FERNANDES, H.; JORET, A. M.; ROCHA, B.; TANCHOT, C. CD8 lethargy in the absence of CD4 helper. **European Journal of Immunology**, v, 32, p. 2199-2207, 2002.

BOYSE, E. A.; OLD, L. J.; STOCKERT, E. Some further data on cytotoxic isoantibodies in the mouse. **New York Academy of Sciences**, v. 99, p. 574-587, 1962.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 19, p. 61-89, 1983.

BROOKS, C. L.; GU, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, n. 15, p. 164-171, 2003.

BRUNO, S.; DARZYNKIERWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60. **Cell Proliferation**, v.25, p. 31-40, 1992.

BURSUKER, I.; NORTH, R.J. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 159, p. 1312-1321, 1984.

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.

CHANDLER, J. P.; YANG, T. J. Canine transmissible venereal sarcoma: distribution of T and B lymphocytes in blood, draining lymph nodes and tumours at different stages of growth. **British Journal of Cancer**, v. 4, p. 514-521, 1981.

CHAPUT, N.; DARRASSE-JEZE, G.; BERGOT, A. S.; CORDIER, C.; NGO-ABDALLA, S.; KLATZMANN, D.; AZOGUI, O. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. **Journal of Immunology**, v. 179, 4969-4978, 2007.

CHEEVER, M. A.; THOMPSON, D. B.; KLARNET, J. P. Antigen-driven long term-cultured T cells proliferate *in vivo*, distribute widely, mediate specific tumor therapy, and persist long-term as functional memory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 1100-1112, 1986.

CHIN, Y.; JANSSENS, J.; BLEUS, J.; VANDEPITTE, J.; VANDENBRANDE, J.; RAUS, J. Characterization of tumour infiltrating lymphocytes in human breast cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 3, p. 27-31, 1993.

CHOUAB, S.; et al. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. **Immunology Today**, v. 18, p. 493-497, 1997.

CLARK JR, W. H.; ELDER, E. E.; GUERRY, D. T. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **Journal National Cancer Institute**, v. 81, p. 1893-1904, 1989.

CLEMENTE, C. G.; MIHM JR, M. C.; BUFALINO, R. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v.77, p. 1303-1310, 1996.

COCKER, J.; FOX, H.; LANGLEY, F. A. Consistency in the histological diagnosis of epithelial abnormalities of the cervix uteri. **Journal of Clinical Pathology**, v. 21, p. 67-70, 1969.

CORONELLA, J. A.; SPIER, C.; WELCH, M.; TREVOR, K. T.; STOPECK, A. T.; VILLAR, H.; HERSH, E. M. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Journal of Immunology**, v. 4, p. 1829-1836, 2002.

COTCHIN, E. Mammary neoplasms of the bitch. **Journal of Comparative Pathology**, v. 68, 1958.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 979-1002.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAN, P.; EVDEMON-HOGAN, M.; CONEJO-GARCIA, J. R.; ZHANG, L.; BUROW, M. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**, v.10, p. 942-949, 2004.

D'ALESSANDRO et al. Immunohistological evaluation of MHC class I and II antigen expression on nevi and melanoma: relation to biology of melanoma. **Pathology**, v.19, n.4, p.339-346, 1987.

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.

DESNOYERS, M. M.; HAINES, D. M.; SEARCY, G. P. Immunohistochemical detection of intermediate filament proteins in formalin fixed normal and neoplastic canine tissues. **Cancer Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 360-365, 1990.

DEVILLE, P.; VAN LEEUWEN, I. S.; VOESTEN, A.; RUTTEMAN, G.R.; VOS, J. H.; CORNELISSE, C. J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**, v.14, p. 2039-2046, 1994.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESCHOUER, N.; WONTERS-BALLMAN, P.; LECLERQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 1118-1194, 1995.

DONNAY, I.; RAUÏS, J.; WOUTERS-BALLMAN, P.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. P. Receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor in normal and tumorous canine mammary tissues. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p. 501-512, 1993.

DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N.; FRYE, F. L.; HILBARD, H. H. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda Country. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 40, p. 307-318, 1968.

ECHCHAKIR, H.; BAGOT, M.; DOROTHÉE, G.; MARTINVALET, D.; LE GOUVELLO, S.; BOUMSELL, L.; CHOUAIB, S.; BENSUSSAN, A.; MAMI-CHOUAIB, F. Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 74-80, 2000.

ELLEDGE, R. M.; ALLRED, D. C. Prognostic and predictive value of p-53 and p21 in breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 52, p. 79-98, 1998.

ELGERT, K. D, ALLEVA, D. G, MULLINS, D. W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 3, p. 275-290, 1998.

ELLING, H.; UNGEMACH, F. R.; Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 105, p. 231-237, 1983.

EVANS, C. R.; PIERREPOINT, C. G. Tissue-steroid interactions in canine hormone-dependent tumours. **Veterinary Record**, v. 24, p. 464-467, 1975.

FEARON, E. R.; PARDOLL, D. M.; ITAYA, T.; et al. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. **Cell**, v. 60, p. 397-403, 1990.

FELTKAMP, M. C.; SMITS, H. L.; VIERBOOM, M. P. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, p. 2242-2249, 1993.

FIDLER, I. J.; BRODEY, R. S. A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 151, p. 710-715, 1967.

FOWLER, E. H.; WILSON, G. O.; KOESTNER, A. Biologic behaviour of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 211-229, 1974.

FRAILE, P. S. M.; BADIOLA, I. A.; REY, J. A. O.; ÁLVAREZ, C.; COSTAS, A. F.; FERNÁNDEZ, M. L.; BOISMORAND, E. P.; TELO, E. Z.; BUCETA, A. de la F. Comparative analysis of p53, Ki-67, bcl-2 and CK20 expression in superficial transitional cell carcinoma of urinary bladder: correlation with recurrence, histological grade and clinical stage. **Actas Urológicas Españolas**, v. 27, n. 8, p. 587-593, 2003.

GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 114-119, 2001.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Overexpression of p53 tumor suppression protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research** v. 58, p. 857-863, 1997.

GARCÍA-TUÑÓN, I.; RICOTE, M.; RUIZ, A.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R.; ROYUELA, M. Interleukin-2 and its receptor complex (alpha, beta and gamma chains) in in situ and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 1-7, 2003.

GASPARINI, G.; BORACCHI, P.; VERDEIRO, P.; BEVILACQUA, P. Cell kinetics in human breast cancer: comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S-phase fraction and that of the antibodies Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. **International Journal of Cancer**, v. 57, p. 822-829, 1994.

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.

GERALDES, M.; GARTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Veterinary Research**, v. 146, p. 403-406, 2000.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BASH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, V.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, 133, p. 1710-1715, 1984.

GERDES, J.; ZENTGRAF, H. Ki67/MIB1 immunostaining in tumor pathology. **European Journal of Histology**, v. 42, p.15, 1998.

GIACCIA, A. J.; KASTAN, M. B. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. **Genes & Development**, v. 12, p. 2973–2983,1998.

GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, D.; ZACHRAW, R. E.; HURVITZ, A. I.; BLACK, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 129-143, 1983.

GORDON, S.; CLARKE, S.; GREAVES, D.; DOYLE, A. Molecular immunobiology of macrophages: recent progress. **Current Opinion in Immunology**, v. 1, p. 24-33, 1995.

GRAHAM, J. C.; MYERS, R. K. The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary International Medicine**, v. 13, p. 416-418, 1999.

GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Research**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.

GREKOU, A. N.; TOLIOU, T.; STRAVORAVDI, P.; PATAKIOUTA, F.; TSOUKALAS, T.; PINAKIDIS, M.; KERAMIDAS, G. Correlation of apoptosis with the distribution and composition of lymphocytic infiltrate in human breast carcinomas. **Anticancer Research**, v. 16, p. 3991-3996, 1996.

GROH, V.; WU, J.; YEE, C.; SPIES, T. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. **Nature**, v. 419, p. 734-738, 2002.

HADDEN, J. W. The immunology and immunotherapy of breast cancer un update. **International Journal Immunotherapy**, v.21, p. 79-101, 1999.

HALAK, B. K.; MAGUIRE, H. C. JR.; LATTIME, E. C. Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. **Cancer Research**, v. 4, p. 911-917, 1999.

HAMILTON, J. M.; ELSE, R. W.; FORSHAW, P. Oestrogen receptors in canine mammary tumours. **Veterinary Research**, v. 101, p. 258-260, 1977.

HAMPE, J. E.; MISDORP, W. Tumors and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, p. 111-113, 1974.

HASLAM, S. Z.; SHYAMALA, G. Effect of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship with lactation. **Biochemical Journal**, v. 182, p. 127-131, 1979.

HELLMEN, E. Prognostic factors in canine mammary tumors. A multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v. 30, n. 1, p. 20-27, 1993.

HSIAO, Y. W.; LIAO, K. W.; HUNG, S. W.; CHU, R. M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. **Journal of Immunology**, v. 3, p. 1508-1514, 2004.

HURLIMANN, J.; GEBHARD, S.; GÓMEZ, F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERDS, HSP27 and cathepsin D invasive ductal breast carcinoma. **Histopathology**, v. 23, p. 239-248, 1993.

INABA, T.; TAKAHASHI, N.; MATSUDA, H.; IMORI, T. Estrogen and progesterone receptors and progesterone metabolism in canine mammary tumors. *Japanese Journal of Veterinary*, v. 46, p. 797, 803, 1984.

JOHNSON, A. S.; COUTO, C. G.; WEGHORST, C. M. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 213-217, 1998.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; RUDAS, M.; KAPPEL, S.; JANSCHKEK, E.; WENZEL, C.; SCHLAGBAUER-WAKL, H.; MITTLBÖCK, M.; GNANT, M.; STEGER, G.; JAKESZ, R. TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2000.

KIM, I. Y.; AHN, H.J.; ZELNER, D. J.; SHAW, J. W.; SENSIBAR, J.A.; KIM, J. H.; KATO, M.; LEE, C. Genetic change in transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF-beta 1 in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 56, p. 44-48, 1996.

KIRKIN, A. F.; DZHANDZHUGAZYAN, K.; ZEUTHEN, J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 665-679, 1998.

KLEIN, L. L.; TRAUTMAN, S.; PSARRAS, S.; SCHNELL, S.; SIERMAN, A.; LIBLAU, R.; VON BOEHMER, H.; KHAZAIE, K. Visualizing the course of antigen-specific CD8 and CD4 T cell responses to a growing tumor. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 806-814, 2003.

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

KRIPKE, M. L. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. **Journal of National Cancer Institute**, v. 53, p. 1333-1336, 1974.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218-224, 2006.

KURTS, C.; CARBONE, F. R.; BARNDEN, M.; BLANAS, E.; ALLISON, J.; HEATH, W.R.; MILLER, J. F. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, p. 2057-2062, 1997.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. prognostic factors in canine mammary tumors. **Sem Vet Sur Small Animal**, v. 1, p. 25-32, 1986.

LANTINGA-VAN LEEUWEN, I. S, VAN GARDEREN, E.; RUTTEMAN, G. R, MOL, J. A. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75: 219-228, 2000.

LECLERC, J. C.; GOMARD, E.; LEVY, J.P. Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornaviruses. I. kinetics and specificity of the immune response in murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors and transplanted lymphomas. **International Journal of Cancer**, v. 10, p. 589-601, 1972.

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.

LEE, K.; JEONG, J.; TSAI, M. J.; TSAI, S.; LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J. Molecular mechanisms involved in progesterone receptor regulation of uterine function. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 102, p. 41-50, 2006.

LEVINGS, M. K.; RONCAROLO, M. G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 109-112, 2000.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J. FINLAY, C. A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature**, v. 351, p. 453-456, 1991.

LUSTER, A. D. The role of chemokines in linking innate and adaptative immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 129-135, 2002.

LIN, W. C.; YASUMURA, S.; SUMINAMI, Y.; SUNG, M. W.; NAGASHIMA, S.; STANSON, J.; WHITESIDE, T. L. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells, expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. **Journal of Immunology**, v. 10, p. 4805-4816, 1995.

LIMA, G. R.; MARTINS, N. V. **Onco Ginecologia**. São Paulo: Atheneu, 1992. p. 17-23.

LOWE, S. W.; BODIS, S.; MACCLATCHEY, A. P53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. **Science**, n. 266, p. 807-810, 1994.

MacEWEN, E. G.; PATNAIK, A. K.; HARVEY, H. J.; PANKO, W. B. Estrogen receptors in canine mammary tumors. **Cancer research**, v. 42, n. 6, p. 2255-2259, 1982.

MacEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer and Metastases Review**, v. 9, n. 1, p. 125-136, 1990.

MACHIELS, J. P.; REILLY, R. T.; EMENS, L. A. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. **Cancer Research**, v. 61, p. 3689-3697, 2001.

MALOY, K.J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, v. 9, p. 816-822, 2001.

MARSIGLIANTE, S.; BISCOZZO, L.; MARRA, A.; NICOLARDI, G.; LEO, G.; LOBREGGIO, G. B.; STORELLI, C. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. **Cancer Letters**, v. 1, p. 33-41, 1999.

MARTÍN de LAS MULAS, J.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor expression and host ant tumor factors as predictors of disease-free period in mammary gland of the dog. **Veterinary Pathology**, v.42, p. 200-212, 2005.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 8, p. 7621-7636, 1999.

MAYR, B.; DRESSLER, A.; REIFINGER, M.; FEIL, C. Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p-53 mutation in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p. 69-78, 1998.

MELONI, F.; VITULO, P.; BIANCO, A. M.; PASCHETTO, E.; MOROSINI, M.; CASCINA, A.; MAZZUCHELLI, I.; CIARDELLI, L.; OGGIONNI, T.; FIETTA, A. M. regulatory CD4+ CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlations with transplant outcome. **Transplantation**, v. 77, p. 762-766, 2004.

MEMPEL, T. R.; PITTET, M. J.; KHAZAIE, K.; WENINGER, W.; WEISSLEDER, R.; VON BOEMER, H.; VON ADRIAN, U. H. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. **Immunity**, v. 25, p. 129-141, 2006.

MILLANTA, F.; CALANDRELLA, M.; BARI, G.; NICCOLINI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v.79, p. 225-232, 2005.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M. VANNOZZI, I.; POLI, A. MIB-1 Labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with post surgical prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 120-126, 2002.

MINAMI, Y.; KONO, T.; MIYAZAKI, T.; TANIGUCHI, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 245-268, 1993.

MISDORP, W.; HART, A. A. M. Prognostic factors in canine mammary cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, p. 779-786, 1976.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n. 1, p.1-59, 1999.

MIZUNO, S.; FUGINAGA, T.; KUROSAWA, T. Changes in lymphokine-activated killer activity in peripheral blood lymphocytes from canine transmissible venereal sarcoma. **Experimental Animal**, v. 45, p.289-292, 1996.

MOL, J. A.; LANTINGA-VAN, I. S.; VAN GARDEREN, E.; SELMAN, P. J.; OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M. A.; SCHALKEN, J. A.; RIJNBERCK, A. Mammary growth hormone and tumorigenesis-lesions from the dog. **Veterinary Quarterly**, v.21. p. 111-115, 1999.

MONSON, K. R.; MALBICA, J. O.; HUBBEN, J. H. Determination of estrogen receptors in canine mammary tumours. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 1937-1939, 1977.

MONACH, P. A.; MEREDITH, S. C.; SIEGEL, C. T. A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. **Immunity**, v. 10, p. 45-59, 1995.

MONLUX, A. W.; ROSZEL, J. F.; McUcam, D. W.; PALMER, T. W. Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 194-217, 1977.

MOORE, A. S.; MADEWELL, B. R.; LUND, J.K. Immunohistochemical evaluation of intermediate filament expression in canine and feline neoplasms. **Am. J. Vet. Res.** v. 50, p. 88-92, 1989.

MOTA, E. F. F.; OLIVEIRA, S. R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n. 30, n. 1, p. 29-47, 1999.

MOTTOLLESE, M; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCIARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, G. N.; Spontaneous canine mammary tumors – a model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 2, p. 182-186, 1994.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In:\_\_\_\_. **Tumors in Domestic Animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, 1990. Cap. 12, p. 518-552.

NAKANO, O; SATO, M; NAITO, Y; SUZUKI, K; ORIKASA, S; AIZAWA, M; SUZUKI, Y; SHINTAKU, I; NAGURA, H; OHTANI, H. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. **Cancer Research**, v. 61, p. 5132-5136, 2001.

NAKANO, M.; TAURA, Y.; INOUE, M. Protein expression of Mdm2 and p53 in hyperplastic and neoplastic lesions of the canine circumanal gland. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 1, p. 27-32, 2005.

NATALI, P.G. NICOTRA, M. R.; BARTOLAZZI, A.; CAVALIERE, R.; BIGOTTI, A. Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: association of the alpha 3/beta 1 heterodimer with tumor progression. **International Journal of Cancer**, v.54, n.1, p.68-72, 1993.

NAUKKARINEN, A.; SYRJANEN, K. Quantitative immunohistochemical analysis of mononuclear infiltrates in breast carcinomas correlation with tumor differentiation. **Journal of Pathology**, v. 160, p. 217-222, 1990.

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

NICHOLSON, R. I.; BOUZUBAR, N.; WALKER, K. J.; McCLELLAND, R.; DIXON, A. R.; ROBERTSON, J. F.; ELLIS, I. O.; BLAMEY, W. Hormone sensitivity in breast cancer: influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation. **European Journal of Cancer**, v. 27, p. 908-913, 1991.

NOGUCHI, Y.; RICHARDS, E. C.; CHEN, Y. T. Influence of interleukin 12 on p53 peptide vaccination against established Meth A sarcoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 2219-2223, 1995.

ORTEGEL, J. W.; STAREN, E. D.; FABER, L. P.; WARREN, W.H.; BRAUN, D. P. Modulation of tumor-infiltrating lymphocyte cytologic activity against human non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 36, p. 17, 2002.

O'REILLY, S. M.; RICHARDS, M. A: Clinical aspects of assessing cell proliferation. In: *Assessment of Cell Proliferation in Clinical Practice*, ed. Hall PA, Levison DA, and Wright NA, pp. 63-79. Springer, London, UK, 1992.

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C. E. Tumor-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 172, p. 229-235, 1994.

PAN, Z. K.; IKONOMIDIS, G.; PARDOLL, D. Regression of established tumors in mice mediated by the oral administration of recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. **Cancer Research**, v. 55, p. 4776-4779, 1995.

PARDOLL, D. M.; TOPALIAN, S. L. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 588-594, 1998.

PARDOLL, D. M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 227-238, 2002.

PASCAL, M.; SEPULCHRE, C.; CHAZAN, J. B.; MAJOIE, B. Evidence for the inhibition of platelet-derived growth factor induced rat smooth muscle cells DNA synthesis by fenofibric acid at the Go/G1 cell cycle level. **Lifes Science**, v. 10, p. 925-933, 1983.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 89, n. 509, p. 10-29, 1994.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors:

Relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 3, p. 237-346, 1998.

PÉREZ-ALENZA, M. D.; PEÑA, L.; NIETO, A. I.; CASTAÑO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 33, p. 581-585, 1997.

PÉREZ, J.; MOZOS, E.; MARTÍN, M. P.; DAY, M. J. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with equine squamous cell carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 4, p. 385-387, 1999.

PICHON, M. F.; PALLUD, C.; BRUNET, M.; MILGROM, E. Relationship of presence of progesterone receptors to prognosis in early breast cancer. **Cancer Research**, v. 40, p. 3357-3360, 1980.

PISARRA, P.; MORTARINI, R.; SALVI, S.; ANICHINI, A.; PARMIANI, G.; SENSI, M. High frequency of T-cell clonal expansion in primary human melanoma. Involvement of a dominant clonotype in autologous tumor recognition. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 48, p. 39-46, 1999.

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.

PRESS, M. F.; GREEN, G. L. Immunohistochemical localization of estrogen and progesterone receptor. In: **Advances in Immunohistochemistry**. ed. Delellis RA. New York, 1988, p. 341-361.

PUPA, S. M.; BUFALINO, R.; INVERNIZZI, A. M.; ANDREOLA, S.; RILKE, F.; LOMBARDI, L.; COLNAGHI, M. I.; MENARD, S. Macrophage infiltrate and prognosis in c-erbB-2 overexpressing carcinomas. **Journal Clin Onc.** v. 14, p. 85-94, 1996.

RABENHORST, S. H. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 40, n. 2, p. 141-147, 1994.

RABINOWICH, H.; COHEN, R.; BRUDERMAN, I.; STEINER, Z.; KLAJMAN, A. Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: lysis of autologous human tumor cells by cultured infiltrating lymphocytes. **Cancer Research**, v. 47, p. 173-177, 1987.

RAYMOND, W. A, LEONG, A. S. The relationship between growth fractions and oestrogen receptors in human breast carcinoma, as determined by immunohistochemical staining. **Journal of Pathology**, v. 3, p. 203-211, 1989.

REICHERT, T. E.; WATKINS, S.; STANSON, J.; JOHNSON, J. T, WHITESIDE, T. L. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. **Journal of Histochemistry and Immunohistochemistry**, v. 5, p. 603-611, 1998.

REISS, M. TGF- $\beta$  and cancer. **Microbes and Infection**, v. 1, p. 1327, 1999.

RIDINGS, J.; MACARDLE, P.J.; BYARD, R. W.; SKINNER, J.; ZOLA, H. Cytokine receptor expression by solid tumours. **Therapeutic Immunology**, v. 2, p. 67-76, 1995.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Barueri: Manole, 2003. 481p.

ROPPONEN, K. M.; ESKELINEN, M. J.; LIPPONEN, P. K.; ALHAVA, E.; KOSMA, V. M. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. **Journal of Pathology**, v. 182, p. 318-324, 1997.

ROSENBERG, S. A. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. **Immunity**, v. 10, p. 281-287, 1999.

ROUSE, B. T.; ROLLINGHOFF, M.; WARNER, N. L. Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumor-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumor. **Nature New Biology**, v. 238, p. 116-117, 1972.

ROYUELA, M.; DE MIGUEL, M. P.; BETHENCOURT, F. R.; FRAILE, B., ARENAS, M. I.; PANIAGUA, R. IL-2, its receptors, and bcl-2 and bax genes in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates: immunohistochemical comparative analysis. **Growth Factors**, v. 2, p. 135-146, 2000.

RUDAS, M.; GNANT, M. F.; MITTLBOCK, M.; NEUMAYER, R.; KUMME, A.; JAKESZ, R.; REINER, G.; REINER, A. Thymidine labeling and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 32, p. 165-175, 1994.

RUNGSIPAT, A.; TATEYAMA, S.; YAMAGUCHI, R.; UCHIDA, K.; MIYOSHI, N.; HAYASHI, T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 27-32, 1999.

RUTTEMAN, G. R. Hormones and mammary tumor disease in the female dog: an update. **In vivo**, v.4, p. 33-40, 1990.

RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W. Hormonal back-ground of canine and feline mammary tumours. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 483-487, 1993.

RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W.; BLANKESTEIN, N. M. A.; VAN DEN BROM, W. E. Oestrogen (ER) and progesterone receptors (PR) in mammary tissues of the female dog: different receptor profile in non-malignant states. **British Journal of Cancer**, v. 58, p. 228-236, 1988.

RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. Tumors of the mammary gland. In: Small animal clinical oncology. 3 ed. Philadelphia: Saunders., 2001, p. 455-467.

SAHIN, A.; RO, J.; RO, I.; BLICK, M. B.; EL-NAGGAR, A. K.; ORDONEZ, N. G.; FRITSCH, H. A.; SMITH, T. L.; HORTOBAGYI, G. N.; AYALA, A. G. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. **Cancer**, v. 68, p. 549-557, 1991.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P. S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 25-34, 2002.

SARTIN, E. A.; BARNES, S.; KWAPIEN, R. P.; WOLFE, L. G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 2196-2200, 1992.

SAKAGUSHI, S.; SAKAGUSHI, N.; ASANO, 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. **Journal of Immunology**, v. 155, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUSHI, S.; SAKAGUSHI, N.; SHIMIZU, J. Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunology Reviews**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SAKAI, H.; NODA, A.; SHIRAI, N.; TIDAKA, T.; YANAI, T.; MASEGI, T. Proliferative Activity of Canine Mast Cell Tumors Evaluated by Bromodeoxyuridine Incorporation and Ki-67 Expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, n. 4, p. 233-238, 2002.

SCHMITT, F.C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathology Research and Practice**, v. 194, p. 815-819, 1998.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D.O.N. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, p. 1249-1261, 1969.

SETALA, L. P.; KOSMA, V. M.; MARIN, S.; LIPPONEN, P. K.; ESKELINEN, M. J.; SYRJÄNEN, K. J.; ALHAVA, E. M. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. **British Journal of Cancer**, v. 74, p. 766-772, 1996.

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.

SHEVACH, E. M.; MCHUGH, R. S.; PICCIRILLO, C. A.; THORNTON, A. M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. **Immunological Reviews**, v. 182, p. 58-67, 2001.

SHIBAKITA, M.; TACHIBANA, M.; DHAR, D. K.; KOTOH, T.; KINUGASA, S.; KUBOTA, H.; MASUNAGA, R.; NAGASUE, N. Prognostic significance of Fas and Fas ligand

expressions in human esophageal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 2464-2469, 1999.

SHU, S.; PLAUTZ, G. E.; KRAUSS, J. C.; CHANG, A. E. Tumor Immunology. **Journal of the American Medical Association**, v. 278, p. 1972-1981, 1997.

SNEAD, D. R. J.; BELL, J. A.; DIXON, A. R.; NICHOLSON, R. I.; ELSTON, C. W.; BLAMEY, R. W.; ELLIS, I. O. Methodology of immunohistochemical detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formaline-fixed paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. **Histopathology**, v.23, p. 233-238, 1993.

SOBCZAK-FILIPIAK, M.; MALICKA, E. Estrogen receptors in canine mammary gland tumours. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 5, p. 1-5, 2002.

SOKOLOWSKA, J.; CYWINSKA, A.; MALICKA, E. p53 expression in canine lymphoma. **Journal of Veterinary Medicine - A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 52, n. 4, p. 172-175, 2005.

SPELLMAN, C. W.; DAYNES, R. A. Ultraviolet light, tumors and suppressor T cells. **Human Pathology**, v. 12, p. 299-301, 1981.

TAYLOR, G. N.; SHAHESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, W. A.; Mc FARLAND, S. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. **Cancer Research**, v. 36, p. 2740-2743, 1976.

TAYLOR, C. R.; COTE, R. J. (Ed.). **Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994. 533p.

TEVETHIA, S. S.; BLASECKI, J. W.; VANECK, G.; GOLDSTEIN, A. L. Requirement of thymus-derived theta-positive lymphocytes for rejection of DNA virus (SV 40) tumors in mice. **Journal of Immunology**, v. 113, p. 1417-1423, 1974.

THOOLEN, R. J. VOS, J. H.; VAN DER LINDE-SIPMAN, J. S.; DE WEGER, R. A.; VAN UNNIK, J. A.; MISDORP, W.; VAN DIJK, J. E. . Malignant fibrous histiocytomas in dogs and cats: immunohistochemical study. **Res. Vet. Sci.** v. 53, p. 198-204, 1992.

THORPE, S. M.; ROSE, C.; RASMUSSEN, B. B.; MOURIDSEN, H. T.; KEIDING, N. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patient with node negative primary breast cancer. **Cancer Research**, v. 47, p. 6126-6133, 1987.

THURÓCZY, J.; REISVAAG, G. J.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 122-129, 2007.

TOSI, P.; BAAK, J. P.; LUZI, P.; SFORZA, V.; SANTOPIETRO, R.; LIO, R. Correlation between immunohistochemically determined oestrogen receptor content, using monoclonal antibodies, and qualitative and quantitative tissue features in ductal breast cancer. **Histopathology**, v. 7, p. 741-751, 1987.

TROJAN, A.; UROSEVIC, M.; DUMMER, R.; GIGER, R.; WEDER, W.; STAHEL, R. A. Immune activation of CD8+ T cells infiltrating non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 44, p. 143-147, 2004.

TSUKAMOTO, T.; et al. Interleukin-6 in renal cell carcinoma. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 1778-1783, 1992.

VAN LEEUWEN, I. S.; HELLMEN, E.; CORNELISSE, C. J.; VAN DEN BURGH, B.; RUTTEMAN, G. R. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. **Anticancer Research**, v. 16, p. 3737-3744, 1996.

VAN RAVENSWAAY CLAASEN, H. H.; KLUIN, P. M.; FLEUREN, G. J. Tumor infiltrating cells in human cancer. On the possible role of CD16+ macrophages in antitumor cytotoxicity. **Laboratory Investigation**, v. 2, p. 166-174, 1992.

VAN ZWIETEN, M. J. General discussion, including brief review of animal models in breast cancer research: the dog. In: **The Rat as an Animal Model in Breast Cancer Research**, p. 215-217, 1984.

VGENOPOULOU, S.; LAZARIS, A. C.; MARKOPOULOS, C.; BOLTETSOU, E.; KYRIAKOU, V.; KAVANTZAS, N.; PATSOURIS, E.; DAVARIS, P. S. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. **Breast**, v. 3, p. 172-178, 2003.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v. 16, p. 249-245, 1998.

VELDHOEN, N.; WATTERSON, J.; BRASH, M.; MILNER, J. Identification of tumor-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. **British Journal of Cancer**, v. 81, p. 409-415, 1999.

VERONESE, S. M.; GAMBACORTA, M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathological features. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 95, p. 30-34, 1991.

VESALAINEN, S.; LIPPONEN, P.; TALJA, M.; SYRJÄNEN, K. Histological grade, perineural infiltration, tumor-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 30, p. 1797-1803, 1994.

VIGUIER, M.; LEMAITRE, F.; VEROLA, O.; CHO, M. S.; GOROCHOV, G.; DUBERTRET, L.; BACHELEZ, H.; KOURILSKY, P.; FERRADINI, L. Foxp3+ expressing CD4+ CD25+ regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 1444-1453, 2004.

WAHL, S. M. Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad, and the ugly. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1587, 1994.

WANG, H. Y.; LEE, D. A.; PENG, G. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. **Immunity**, v. 20, p. 107-118, 2004.

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

WARD, P. L.; KOEPPEN, H. K.; HURTEAU, T. Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escape from CD8+ T-cell-dependent surveillance. **Cancer Research**, v.50, p. 3851-3858, 1990.

WILLIAMSON, M. M.; MIDDLETON, D. J. Cutaneous soft tissue tumours in dogs: classification, differentiation, and histogenesis. **Veterinary Dermatology**, v. 9, p. 43-48, 1998.

WINTZER, H. O.; ZIPFEL, I.; SCHULTE-MÖNTING, J.; HELLERICH, U.; VON KLEIST, S. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 15, p.421-428, 1991.

WHITESIDE, T. L.; HERBERMAN, R. B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, p. 704-710, 1995.

WHITESIDE, T.L. MIESCHER, S.; HURLIMANN, J.; MORETTA, L.; VON FLIEDNER, V. Separation, phenotyping and limiting dilution analysis of T- lymphocytes infiltrating human solid tumors. **International Journal of Cancer**, v.37, p 803, 1986

WOLFEL, T.; VAN PEL, A.; BRICHARD, V. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytotoxic T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 24, p. 759-762, 1994.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. **Journal of Veterinary Medicine – A Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68, 2006.

YANASE, M.; TSUKAMOTO, T.; KUMAMOTO, Y. Cytokines modulate in vitro invasiveness of renal cell carcinoma cells through action on the process of cell attachment to endothelial cells. **Journal Urol.** v.153, p. 844-848, 1995.

YANG, W. Y.; LIU, C. H.; CHANG, C. J.; LEE, C. C.; CHANG, K. J.; LIN, C. T. Proliferative activity, apoptosis and expression of oestrogen receptor and Bcl-2

oncoprotein in canine mammary gland tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, p. 70-79, 2006.

YU, P.; LEE, Y.; LIU, W.; CHIN, R. K.; WANG, J.; WANG, Y.; SCHIETINGER, A.; PHILIP, M.; SCHREIBER, H.; FU, Y. X. Priming of naïve T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. **Nature Immunology**, v.5, p. 141-149, 2004.

YU, P.; LEE, Y.; LIU, W.; et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p.779-791, 2005.

YU, P.; FU, Y. X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes. **Laboratory Investigation**, v. 86, p. 231-245, 2006.

ZACCHETTI, A.; VAN GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J. H.; RUTTEMAN, G. R. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labeling by immunohistochemistry. **Acta Pathologica, microbiologica et Immunologica**, v. 111, p. 430-438, 2003.

ZEIMET, A. G.; MÜLLER-HOLZNER, E.; MARTH, C.; DAXENBICHLER, G. Immunocytochemical versus biochemical receptor determination in normal and tumorous tissues of the female reproductive tract and the breast. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, p.365-372, 1994.

ZENG, G. MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells: new strategies for cancer vaccine design. **Journal of Immunotherapy**, v. 24, p. 195-204, 2001.

ZHANG, L.; CONEJO-GARCIA JR.; KATSAROS, D. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 203-213, 2003.

ZUCCARI, D. A. P. C. **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas**. 2001. 92p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

ZUCCARI, D. A. P. C.; TERZIAN, A. C. B. ; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; ANDRADE, J. C. A.; CORDEIRO, J. A. Avaliação imunohistoquímica do gene p53 nas neoplasias mamárias caninas. **ARS Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 344-350, 2005.