

ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS
CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CADELAS**

**Belo Horizonte
2011**

ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA

**Caracterização da Resposta Inflamatória nos Carcinomas Mamários
em Cadelas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Geral
Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali
Co-Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2011**

L732c Lima, Alessandra Estrela da Silva.
Caracterização da resposta inflamatória nos carcinomas mamários em
cadelas [manuscrito]. / Alessandra Estrela da Silva Lima. -- Belo
Horizonte: 2011.
154f: il.
Orientador: Geovanni Dantas Cassali.
Co-orientadora: Rogéria Serakides.
Área de concentração: Patologia Geral.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Carcinoma. 2. Glândulas Mamárias Animais. 3. Linfócitos T. 4.
Imunofenotipagem. 5. Citometria de Fluxo. 6. Inflamação. 7. Cães. 8.
Dissertações Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Serakides,
Rogéria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 200

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190/sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

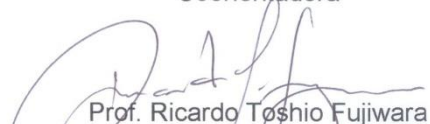
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Geovanni Dantas Cassali, Rogéria Serakides, Ricardo Toshio Fujiwara, Christina Malm, Carlos Roberto Daleck e Alfredo Ribeiro da Silva, aprovou a defesa da tese intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS”**, apresentada pela doutoranda **ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA**, para obtenção do título de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 25 de fevereiro de 2011.



Prof. Geovanni Dantas Cassali
Orientador



Profa. Rogéria Serakides
Coorientadora



Prof. Ricardo Toshio Fujiwara



Profa. Christina Malm



Prof. Carlos Roberto Daleck



Prof. Alfredo Ribeiro da Silva



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpqz/medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA**, nº de registro 2007652328. Às quatorze horas do dia **25 de fevereiro de dois mil e onze**, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de defesa de tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS”**, requisito final para a obtenção do grau de Doutora em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG - Área de Concentração em Patologia Geral. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Geovanni Dantas Cassali, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Geovanni Dantas Cassali /Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Rogéria Serakides/Coorientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Ricardo Toshio Fujiwara	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Profa. Christina Malm	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Carlos Roberto Daleck	Instituição: UNESP	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Alfredo Ribeiro da Silva	Instituição FMRP/USP	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações, a candidata foi considerada APROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2011.

Prof. Geovanni Dantas Cassali _____

Profa. Rogéria Serakides _____

Prof. Ricardo Toshio Fujiwara _____

Profa. Christina Malm _____

Prof. Carlos Roberto Daleck _____

Prof. Alfredo Ribeiro da Silva _____

Prof. Wagner Luiz Tafuri (Coordenador) _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo de Coordenação.

Prof. Wagner Luiz Tafuri
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina/UFMG

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?”

Geoge Bernard Shaw

À minha pequenina Maria Eduarda...

“... só faltava você pra ficar perfeito.”

AGRADECIMENTOS

A Deus porque fostes testemunha das dificuldades do percurso e aliado nas superações.

À minha família: Marco Antonio, companheiro de uma vida, pelo amor, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas; Maria Eduarda, minha pitanguinha, que com seu sorriso banguela me faz acreditar que posso conquistar o mundo; e a minha avó Maria, por estar sempre torcendo e rezando para que os meus objetivos sejam alcançados, mesmo sem entender muito bem o que está acontecendo...tudo que sou é por vocês e pra vocês!!!

Ao meu orientador Prof. Geovanni Cassali por todas as oportunidades concedidas de crescimento pessoal e acadêmico. Pela sua competência, seriedade e principalmente coragem de ousar trabalhar com novas idéias, técnicas e conceitos, mesmo correndo os riscos inerentes a esta atitude. A quem dedico admiração pela paixão à pesquisa e ao trabalho, por sua trajetória de vida e por todos os ensinamentos na área de patologia mamária nestes anos de convivência.

A minha co-orientadora Rogéria Serakides, um grande exemplo pessoal e profissional. Para mim é uma imensa honra e orgulho tê-la como amiga e saber que posso contar com os seus ensinamentos, preciosos conselhos e inestimável confiança. Muito obrigada!!!

Ao Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, representado pelos doutores Olindo Martins-Filho, Andréa Teixeira e Márcio Sobreira, por disponibilizarem a estrutura, equipamentos e materiais necessários a realização das imunofenotipagens e principalmente pela preciosa contribuição no delineamento, elaboração e correção dos trabalhos científicos.

A Lorena Rocha, por seu carinho, dedicação extrema, paciência, incentivo, participação ativa na elaboração e correção do texto e acima de tudo, por me ajudar a superar os obstáculos durante toda caminhada. Sem você seria muito mais difícil conseguir chegar até aqui, saiba que essa tese é nossa, xyz!

A Karine, minha eterna “fiote” agora o meu elo Bahia/Minas, sempre disposta, dedicada e amiga. ‘E muito bom saber que posso contar com você sempre. Muito obrigada por seu apoio nos momentos de decepção ou sucesso, você faz parte dessa estória.

A minha mãe, Amália, pelas sugestões e correções na fase conclusiva deste estudo, pelo apoio que me encorajou nesta reta final, apesar de tantas dificuldades, a não desistir do meu sonho. Aos meus irmãos, Anderson e Christiane Estrela que sempre me apoiaram e acreditaram na concretização dos meus ideais.

Ao meu sogro, Francisco Antonio, pelo apoio, torcida, alegria, confiança e palavras de incentivo nos momentos de dificuldade.

A Natalie Borges, grande amiga e irmã de alma e coração, por sua serenidade diante dos meus problemas, apoio incondicional e presença constante, nos momentos de incerteza ou descobertas. Valeu Mourisca, mas do que nunca estamos “juntas e misturadas”.

Ao meu amigo de fé, irmão e camarada Prof. João Moreira por ter acreditado incondicionalmente neste projeto, possibilitando com generosidade e confiança, a sua realização no HOSPMEV/UFBA.

A minha irmã Natalia Ocarino de Melo, por se fazer sempre presente, mesmo a distância, pela amizade, confiança e estímulos constantes ao longo destes anos.

A todos os professores, técnicos, residentes e estagiários dos setores de Clínica e Cirurgia, Laboratórios de Infectologia e Patologia Clínica e especialmente aos amigos do Setor de PATOLOGIA do HOSPMEV/UFBA, pela disposição em ajudar e por me mostrarem, a todo o momento, que poderia contar com vocês. Muito obrigada Altemar Teixeira pela amizade, confiança, incentivo, investimento, auxílio prestado sempre com tanta gentileza e por facilitar todas as coisas, em todos os momentos.

Ao prof. Eduardo Moreira por sua amizade, conselhos preciosos, bom senso e contribuição decisiva para minha liberação das atividades acadêmicas, possibilitando assim, a realização deste grande sonho. Muito obrigada meu amigo!

Aos meus filhos patológicos e cirúrgicos (Familia LABOP) Arquimedes, Adriano, Thiago, Lorena, Karine, Soraya, Humbertinho, Danielle, Nancy, Isabel e Deusdete Júnior, meus fiéis escudeiros, que compartilharam comigo durante todo o experimento o sabor das descobertas e também das frustrações, pela amizade, dedicação e confiança renovada a cada dificuldade... Obrigada por tudo!

A todos os amigos e colegas que passaram, permanecem ou acabam de chegar ao Laboratório de Patologia Comparada (LPC): Enio, Angélica, Mariana, Wanessa, Gleidice, Nazir, Patrícia, Gustavo, Renata, Cristina, Conrado e Liliane com os quais tive o prazer de desfrutar momentos extremamente agradáveis.

Aos colegas veterinários Mário Jorge, Raquel Teixeira, Júlia Moreno e Sabrina pelo inestimável contribuição na fase experimental. Não poderia esquecer Guga, que não é macaco gordo, mas sempre quebra meus galhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, por me receberem de maneira tão acolhedora e pela oportunidade de participar desta grande escola.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia, em especial ao Enio, Vanessa, Jerusa, Mara, Wanessa e Cristina convivência pra lá de agradável, pelas risadas intermináveis, cumplicidade e carinho que marcaram nossos dias.

À Universidade Federal da Bahia, em especial ao Departamento de Patologia e Clínicas pela oportunidade de cursar o Doutorado, proporcionando a conclusão de mais uma valiosa etapa, indispensável para minha formação acadêmica.

Aos meus filhos caninos; Edú, Bruce (*in memoriam*), Apolo, Mel e Príncipe, tamanha a felicidade com que me recebiam a cada retorno pra casa após um dia cansativo e aparentemente interminável de experimento ou discussão dos resultados...

Aos proprietários e principalmente as cadelas que participaram desta pesquisa, pois sem elas nenhuma dessas páginas estaria completa ou faria sentido. É a vontade de ajuda-las que me faz seguir em frente fazendo perguntas e buscando respostas.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada (LPC)/ Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto/EMEV-UFBA e Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM)/ Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

Resumo	xiv
Abstract	xv
Lista de Tabela	xvi
Lista de Figura	xvii
Lista de Anexo	xviii
Abreviaturas	xix
1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
Capítulo I: Câncer da Mama em Cadelas	24
<u>Aspectos Gerais</u>	24
<u>Marcadores Prognósticos no câncer de mama</u>	28
Capítulo II - Sistema Imune e Câncer	33
<u>Aspectos Gerais</u>	33
<u>Inflamação e Câncer</u>	37
<u>Linfócitos e Câncer de mama</u>	41
3. HIPÓTESES	47
4. OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo Geral	47
4.2 Objetivos Específicos	47
5. MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1 Seleção de animais e Avaliação clínica	49
5.2 Acompanhamento e Sobrevida	50
5.3 Biópsia Excisional e Histopatológico	50
5.4 Caracterização da Neoplasia	51
5.4.1 <u>Classificação Histológica</u>	51
5.4.2 <u>Graduação Histológica</u>	52
• <u>Formação Tubular</u>	52
• <u>Pleomorfismo Nuclear</u>	52
• <u>Contagem Mitótica</u>	52
• <u>Alocação do Grau Histológico</u>	53
5.5 Identificação fenotípica das diferentes populações	53

leucocitárias nos processos inflamatórios associados aos tumores mamários caninos	
5.5.1 <i>Análise Morfológica e Morfométrica do Infiltrado inflamatório Tumoral</i>	53
5.5.2 <i>Imunofenotipagem dos Leucócitos Infiltrantes no Tumor</i>	55
5.5.3 <i>Obtenção do Sangue Periférico</i>	56
5.5.4 <i>Ensaio de Imunofenotipagem Celular no contexto ex vivo</i>	56
5.5.5 <i>Obtenção e Análise de Dados por Citometria de Fluxo</i>	57
5.5.6 <i>Avaliação do Desempenho dos Parâmetros Fenotípicos Celulares</i>	58
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
7. PROTOCOLO - Comitê de Ética em Experimentação Animal	59
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
• Artigo 1: Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates.	60
• Artigo 2: Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers.	91
9. CONCLUSÕES	124
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	126
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
12. ANEXOS	141

RESUMO

Foram realizados dois experimentos distintos utilizando cadelas portadoras de carcinoma mamário, com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória associada ao tumor e realizar a imunofenotipagem dos leucócitos no sangue periférico por citometria de fluxo. No primeiro experimento foram estudados 51 tumores mamários classificados histologicamente em dois grupos: carcinomas em tumores mistos (MC-BMT=31) e carcinomas (MC=20), os quais foram submetidos à análise morfométrica das células inflamatórias e avaliação clínico-patológica sistemática, além da avaliação da taxa de sobrevivência das cadelas. A partir desses parâmetros, foi observado que o grupo MC estava associado com maior frequência a estadiamento clínico avançado, elevado grau histológico e metástase pulmonar. A inflamação foi mais difusa e intensa no grupo MC, quando comparado ao grupo MC-BMT, sendo os linfócitos o tipo celular predominante. A análise multivariada mostrou que apenas infiltrado linfocítico de intensidade ≥ 600 ($P=0,02$) foi um fator prognóstico independente. Foram selecionados ainda 24 animais (MC-BMT=16 e MC=8) para determinação dos subtipos de linfócitos infiltrantes no tumor. A porcentagem de células T foi maior nos animais do grupo MC-BMT, sem metástase, enquanto a porcentagem de linfócitos B foi maior nos animais com metástases MC-BMT ($P < 0,05$). A porcentagem relativa de linfócitos T CD4⁺ foi significativamente maior nos animais com metástases (ambos MC-BMT e MC), ($P < 0,05$), enquanto a proporção de células T CD8⁺ células foi maior no MC-BMT sem metástase. Independentemente do tipo de tumor, os animais com elevada proporção de células T CD4⁺ e baixa de células T CD8⁺ apresentaram menor taxa de sobrevivência. Aparentemente, o subtipo de linfócito, a quantidade e o momento do início da resposta inflamatória, induzida pela ação de citocinas, são fatores que definem se o processo inflamatório atuará como promotor ou inibidor do desenvolvimento tumoral. No segundo experimento foram avaliadas 49 cadelas (MC-BMT=29 e MC=20) para determinação do perfil de leucócitos no sangue periférico, sendo observado que os linfócitos T CD4⁺ estão associados à progressão tumoral, enquanto os linfócitos T CD8⁺ inibem o desenvolvimento tumoral. A partir desta análise, foram propostos dois parâmetros, razão CD4⁺/CD8⁺ para o grupo MC-BMT e IMF (Intensidade Média de Fluorescência) em monócitos para o grupo MC, os quais apresentaram significativo valor clínico e prognóstico, possibilitando a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência ou morte, respectivamente. Estes resultados podem auxiliar a melhor compreensão sobre a heterogeneidade imunológica dos carcinomas mamários caninos, fornecendo ferramentas alternativas no estabelecimento de possíveis protocolos terapêuticos baseados no perfil imunofenotípico desses tumores.

Palavras-chave: inflamação, linfócitos T, imunofenotipagem, citometria de fluxo, carcinoma-mamário, cadelas, biomarcadores

ABSTRACT

Two different experiments were conducted using female dogs with mammary carcinoma, in order to characterize the inflammatory response associated with cancer and perform immunophenotyping of leukocytes in peripheral blood by flow cytometry. In the first experiment we studied 51 breast tumors, histologically classified into two groups: carcinoma in mixed tumors (MC-BMT=31) and carcinomas (MC=20), which were submitted to morphometric analysis of inflammatory cells and clinical-pathological systematic, and was determining the survival rate of dogs. From these parameters, we found that the MC group was associated with advanced clinical stage, high histological grade and lung metastasis. The inflammation was more diffuse and intense in the MC group, when compared to MC-BMT, lymphocytes being the predominant cell type. Multivariate analysis showed only lymphocytic infiltrate intensity ≥ 600 ($P = 0.02$) was an independent prognostic factor. Further 24 animals were selected (MC-BMT = 16 and MC=8) to determine the subtypes of infiltrating lymphocytes in the tumor. The percentage of T cells was higher in group MC-BMT, without metastasis, while the percentage of B lymphocytes was higher in animals with metastases MC-BMT ($P < 0.05$). The relative percentage of $CD4^+$ T lymphocytes was significantly higher in animals with metastases (both MC-BMT and MC) ($P < 0.05$), while the proportion of $CD8^+$ cells was higher in MC-BMT without metastasis. Whatever type of tumor, the animals with a high proportion of $CD4^+$ T cells and low $CD8^+$ T cells showed a lower survival rate. Apparently, the subtype of lymphocyte, the amount and timing of initiation of the inflammatory response induced by cytokines, are factors that define the inflammatory process will act as a promoter or inhibitor of tumor development. In the second experiment were evaluated 49 bitches (MC-BMT=29 and MC=20) to determine the profile of leukocytes in peripheral blood and observed that the $CD4^+$ T cells are associated with tumor progression, while the $CD8^+$ T cells inhibit tumor development. From this analysis, we proposed two parameters, $CD4^+ / CD8^+$ ratio for the group MC-BMT and IMF in monocytes for the MC group, which showed significant clinical and prognostic value, allowing the segregation of dogs with a high probability of survival or death, respectively. These results may help better understanding of the immunologic heterogeneity of canine mammary carcinomas, providing alternative tools to establish possible therapeutic protocols based on the immunophenotypic profile of these tumors.

Keywords: inflammation, T lymphocytes, immunophenotyping, flow cytometry, mammary-carcinoma, female dog, biomarkers

LISTA DE TABELAS

Materiais e Métodos

Tabela 1.	Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular	141
Tabela 2.	Intervalo de intensidade dos tipos celulares nos carcinomas mamários	54

Artigo 1 - Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates

Table 1.	Pathological and clinical status of mammary carcinomas in female dogs	82
Table 2.	Morphological and morphometric analysis of inflammatory infiltrate associated with mammary carcinomas in female dogs	83
Table 3.	Univariate and multivariate analysis of clinical-pathological parameters associated with low survival rates	83
Table 4.	Association between clinical-pathological and parameters with distinct intervals of lymphocytic infiltrate intensity	84

Artigo 2 - Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers

Table 1.	Pathological clinical features of study population	111
Table 2.	Hematological parameters in canine mammary carcinoma	111

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 - Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates

Figure 1	Histological diagnosis of canine mammary carcinoma samples.	85
Figure 2	Composition of inflammatory infiltrate associated with canine mammary carcinoma.	86
Figure 3	Immunophenotypic profile of tumor infiltrating lymphocyte in canine mammary carcinomas.	87
Figure 4	Survival rates of animals with canine mammary carcinoma.	88
Figure 5	Survival rates of animals with canine mammary carcinoma.	89
Figure 6	Survival rates of animals with canine mammary carcinoma.	90

Artigo 2 - Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers

Figure 1	Lymphocyte subsets in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas.	112
Figure 2	Lymphocyte activation status in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas.	114
Figure 3	Monocytes activation status in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas.	116
Figure 4	Lymphocyte subsets and monocytes activation status in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas.	118
Figure 5	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-cell ratio in peripheral blood and survival of female dogs with mammary carcinomas in benign mixed tumors - mc-bmt.	120
Figure 6	MHC I expression by monocytes in peripheral blood and survival of female dogs with mammary carcinomas - MC.	122

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Protocolo para exame anatomopatológico de tumores mamários caninos-modificado de Ferreira, et al. (2003).	141
Anexo 2	Estadiamento clínico (TNM) utilizado para carcinomas de mama da cadela (modificado de Owen, 1980).	143
Anexo 3	Tabela 1 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular	144
Anexo 4	Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal	145
Anexo 5	Comprovante de submissão do artigo “Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers” à Revista <i>Breast Cancer Research and Treatment</i>	146
Anexo 6	Produção científica no período de Fevereiro de 2007 a Fevereiro de 2011	147

ABREVIATURA

Ac Anticorpo

Ag Antígeno

ALT Alanina amino transferase

APC Célula apresentadora de antígeno

BSA Albumina bovina sérica

CD3 Marcador de superfície celular da população de linfócitos T

CD4 Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares /
indutores

CD5 Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD8 Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos /
supressores

CD14 Marcador de superfície celular da população de monócitos

CD18 Marcador de molécula de adesão

CD31 Marcador de células endoteliais

CETEA Comitê de Ética em Experimentação Animal

CGA Campo de maior aumento

CIA *Confidence Interval Analysis*

CMF Canal Médio de Fluorescência

COX Ciclooxygenase

CPqRR Centro de Pesquisas René Rachou

CSF Fator estimulador de colônia

CTLs Linfócitos T citotóxicos

DCs Células dendríticas

EDTA Ácido etileno-diamino tetracético

EGF Fator de crescimento epidérmico

EMEV Escola de Medicina Veterinária

FA Fosfatase alcalina

FACS Fluorescence Activated Cell Sorter

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FL Fluorescência

FL1 Fluorescência do tipo 1

FL2 Fluorescência do tipo 2

FL3 Fluorescência do tipo 3
FSC *Forward Scatter* (Tamanho celular)
g Grama
g/l Grama/litro
GM-CSF
HE Hematoxilina- eosina
HOSPMEV Hospital de Medicina Veterinária
ICB Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)
IFN- γ Interferon gamma
Ig Imunoglobulinas
IL Interleucina
IMF Intensidade Média de Fluorescência
KIR *killer immunoglobulin-like receptors*
KCl Cloreto de potássio
KH₂PO₄ Fosfato Mono Potássico
LABAP Laboratório de Anatomia Patológica
LBDM Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração
LLD látero-lateral direita
LLE látero-lateral esquerda
LPC Laboratório de Patologia Comparada
LR *likelihood ratio*
MFF Solução fixadora
MHC I Complexo principal de histocompatibilidade do tipo I
MHC II Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
mL mililitro
MIB-1 marcador do índice proliferativo do tumor
NaCl Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ Fosfato monoácido de sódio
NK *Natural killers*
OMS Organização Mundial de Saúde
PE-Cy-5 Ficoeritrina conjugada com cianina
OSH ovariosalpingohisterectomia
PBS Salina tamponada com fosfato
PE Ficoeritrina

PMN Polimorfonuclear
RE Receptor de estrógeno
ROC A *receiver operating characteristic curve*
RP Receptor de progesterona
RV Razão de verossimilhança
SSC Side Angle Light Scatter (Granulosidade celular)
TGF- β Fator de crescimento e transformação beta
Tregs Células T reguladores
TNM Tumor/linfonodo/metástase
Th Células T helper
Th1 Celulas T CD4 secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2 Celulas T CD4 secretoras do padrão 2 de citocinas
TMA Tissue microarray
UFBA Universidade Federal da Bahia
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais
VD Ventro-dorsal
VEGF Fator de crescimento endotélio vascular
VPN Valor preditivo negativo
VPP Valor preditivo positivo
 μ L microlitro

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários espontâneos dos caninos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas, semelhantes ao da espécie humana (Misdorp, 2002). Assim, as neoplasias espontâneas de mama em cadelas têm sido propostas, por muitos pesquisadores, como modelo adequado para estudos comparativos com a espécie humana (Peleteiro, 1994; Cassali et al, 2007; Genelhu *et al.*, 2007; Bertagnolli *et al.*, 2009; Uva *et al.*, 2009).

Existem três linhas de evidências que fortalecem a hipótese de que a inflamação crônica promove o desenvolvimento de certos tipos de cânceres. Primeiro, observa-se que diversas desordens clínicas estão associadas tanto com a presença de inflamação crônica quanto com o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias. Em seguida, deve ser considerado, que durante o desenvolvimento tumoral, ocorre um aumento na expressão de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, da enzima COX-2 e por fim, a existência de dados clínicos, epidemiológicos e experimentais de que antiinflamatórios não esteroidais inibem a progressão de certos tumores (William *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2003; Doré *et al.*, 2003; Thun *et al.*, 2004).

O processo inflamatório associado ao desenvolvimento neoplásico envolve uma complexa resposta do hospedeiro (Stewart e Heppner, 1997). Acredita-se que, em determinadas situações, as células responsáveis pela modulação da resposta inflamatória liberem fatores autócrinos e parácrinos que estimulam a proliferação celular, inibem a apoptose, induzem a angiogênese, alterando desta forma, a resposta do sistema imune a agressão (Stewart e Heppner, 1997; Coussens e Werb, 2001; Marx, 2004). Esses fatores em conjunto podem acelerar a mutagênese e promover a sobrevivência de clones atípicos com maior capacidade de invasão de tecidos e órgãos (Thun *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm sugerido que a identificação das subpopulação de células T (linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e células T reguladoras), bem como, das citocinas, fornecem um método sensível e importante para avaliar a imunidade celular em pacientes com câncer (Macchetti *et al.*, 2006; Whiteside, 2008). Entretanto, não existe consenso quanto à eficácia da resposta

antitumoral mediada por linfócitos, bem como sobre a subpopulação predominante (Whiteside *et al.*, 1986, Camp *et al.*, 1996, Ben-Baruch, 2003; De Nardo e Coussen, 2007).

Na medicina tem sido relatado que os linfócitos infiltrantes no tumor, assim como os linfócitos do sangue periférico de mulheres com câncer em estadios avançados correlacionam-se com uma resposta imunológica ineficaz e menor sobrevida (Miescher *et al.*, 1986). Winnicka e colaboradores (2002) afirmam que a imunofenotipagem dos linfócitos presentes no sangue periférico e tecidos também pode ser utilizada, na medicina veterinária, para diagnóstico em pacientes oncológicos. No entanto, os linfócitos do sangue periférico e os linfócitos infiltrantes nos carcinomas mamários e sua relação com fatores prognósticos e taxa de sobrevida da cadela não tem sido estudado.

Cabe ressaltar ainda que os tumores de mama são neoplasias imunogênicas e diversas estratégias em imunoterapia vêm sendo testadas, as quais podem fornecer resultados satisfatórios. A diferenciação do fenótipo Th1, sabidamente efetor em casos de neoplasias, pode ser obtida pela manipulação das citocinas que iniciam a resposta imune, a partir da utilização de vacinas adjuvantes. Alternativamente, células T tumor-específicas podem ser isoladas do infiltrado tumoral e ter o seu fenótipo modificado *in vitro* e cultivada em meio de cultura específico (Disis e Park, 2009). Desta forma, é possível que a polarização da resposta imune linfocítica anti-tumoral resulte em benefícios clínicos importantes.

Nesse contexto, compreender o complexo perfil imunológico associado com os aspectos clínicos do câncer de mama é o primeiro passo para identificar biomarcadores aplicáveis na monitoração da progressão tumoral, bem como possibilitar o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas antineoplásicas eficazes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Capítulo I: Câncer da Mama em Cadelas

Aspectos Gerais

A neoplasia de mama é a tumor mais freqüente nas fêmeas, principalmente em mulheres (Henderson e Feigelson, 2000; Ingvarson, 2001) e cadelas (Bostock, 1986; Peleteiro, 1994; Cassali, 2000; Misdorp, 2002), e na espécie canina, representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias, sendo que, no momento do diagnóstico metade delas já possui caráter maligno (Queiroga e Lopes, 2002; Todorova, 2005; De Nardi, 2007) .

Estas lesões espontâneas da cadela têm despertado grande interesse dos pesquisadores, principalmente devido à elevada freqüência de tumores malignos, em grande parte, reflexo do diagnóstico tardio, que compromete o tratamento e reduz a taxa de sobrevivida dos animais (Silva *et al.*, 2004; Cavalcanti, 2006; Toríbio, 2008; Andrade *et al.*, 2010).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, com a participação de componentes genéticos, ambientais, nutricionais e principalmente hormonais (Henderson e Feigelson, 2000; Uva *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2010). Os hormônios atuam estimulando a proliferação celular, predispondo às alterações genéticas que darão origem à célula neoplásica (Silva *et al.* 2004). O estrógeno, a prolactina (Deng e Brodie, 2001), a progesterona (Vorherr, 1987), os andrógenos (Kodama e Kodama, 1970) e até mesmo os hormônios tireoidianos estão envolvidos na carcinogênese mamária (Nogueira e Brentani, 1996; Silva *et al.*, 2007) a partir de mecanismos ainda não totalmente elucidados.

Os hormônios esteróides apresentam uma importante participação na patogênese da neoplasia mamária na cadela, semelhante ao que ocorre na mulher (Pereira *et al.*, 2008). Schneider *et al.* (1969) verificaram o efeito protetor da ovariosalpingohisterectomia (OSH) a depender do número de ciclos estrais apresentados pela cadela antes do procedimento cirúrgico. Quando a OSH foi realizada antes do primeiro cio, o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária foi de 0,5%. Este risco aumentou para 8% e 26% quando a esterilização ocorreu após o segundo e o terceiro ciclo estral, respectivamente.

Entretanto, não há consenso na literatura quanto ao efeito protetor da OSH quando esta é realizada após o início do desenvolvimento neoplásico. A maioria dos autores discorda da capacidade protetora da OSH após o terceiro ciclo estral, independente da presença do processo neoplásico (Schneider *et al.*, 1969; Ferguson, 1985; Yamagami *et al.*, 1996, Morris *et al.*, 1998, Lana *et al.*, 2007). Contudo, Sorenmo *et al.* (2000) relatam maior sobrevivência das cadelas submetidas à mastectomia associada à castração ou quando esta é realizada até 24 meses antes da exérese do nódulo primário.

O risco de desenvolvimento do câncer de mama em cadelas aumenta significativamente com a idade, acometendo com maior frequência a faixa etária entre nove e onze anos, sendo baixa a ocorrência em cadelas com menos de cinco anos e rara quando inferior a dois anos (Misdorp, 2002). Outros fatores relacionados com a incidência destes tumores incluem o tratamento com progestágenos, a obesidade nos primeiros anos de vida e a dieta baseada em comida caseira (Peña *et al.*, 1998; Zucari *et al.*, 2008). Recentemente Andrade e colaboradores (2010) demonstraram a presença de concentrações significativas de inseticidas piretróides no tecido adiposo adjacente aos tumores mamários de cadelas, principalmente, nos tumores mais agressivos, sugerindo o possível envolvimento de contaminantes ambientais na carcinogênese mamária.

Aparentemente não existe predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na espécie canina (Peleteiro, 1994; Daleck *et al.*, 1998; Cavalcanti e Cassali, 2006), no entanto algumas raças são apontadas por alguns autores como mais frequentemente acometidas. Mitchell e colaboradores (1974), ao estudar a frequência de aparecimento de neoplasias mamárias em uma cidade do Canadá, observou que cadelas das raças poodle, cocker spaniel, dachshund e labrador apresentam maior susceptibilidade. No Brasil, são observadas principalmente em cães sem raça definida e mestiços de poodle (Cavalcanti, 2006; Toríbio, 2008; Damasceno, 2009; Lavalle *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009).

Os tumores mamários na cadela apresentam-se, geralmente, como nodulações circunscritas, com dimensões, consistência e mobilidade à pele e musculatura variáveis, podendo estar associados à ulceração cutânea e reações inflamatórias locais. Frequentemente são observados múltiplos tumores em uma mesma mama ou envolvendo simultaneamente várias mamas (tumores multicêntricos), os quais podem apresentar diferentes tipos histológicos (Kurzman e Gilbertson, 1986; Misdorp *et al.*, 1999). Contudo, o tumor de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (Cavalcanti e Cassali, 2006).

A construção do diagnóstico inicia-se com a coleta de informações referentes ao histórico clínico e reprodutivo do animal, realização de exame físico detalhado, e verificação da presença de sinais sistêmicos em decorrência de possíveis metástases (Misdorp, 2002). Alguns sinais sistêmicos como dispnéia, tosse e claudicações também podem ocorrer devido à disseminação desses tumores. A inspeção dos linfonodos regionais deve ser incluída na rotina de avaliação dos cães com tumores mamários, pois a positividade para metástase altera o estadiamento clínico do animal, a sobrevida e a abordagem do tratamento (Cavalcanti, 2006). Os principais órgãos acometidos pela disseminação tumoral são os linfonodos regionais (inguinais superficiais e axilares), pulmão, e com menor frequência, rim, fígado, baço, pele, glândulas adrenais, encéfalo, olhos e esqueleto (Peleteiro, 1994; Perez Alenza *et al.*, 2000).

O estadiamento clínico é feito de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para os tumores mamários caninos. Com base nesse sistema devem ser avaliados tamanho da lesão primária (T), disseminação para os linfonodos regionais (N) e presença ou ausência de metástases à distância (M) (Owen, 1980). A distribuição dos animais em estadios permite o planejamento de tratamentos e a avaliação dos resultados, além de fornecer indicação prognóstica, facilitando também a troca de informações entre os centros de tratamento (Queiroga e Lopes, 2002).

A análise citológica realizada a partir do aspirado por agulha fina é útil principalmente quando se suspeita de metástases para linfonodos (Cassali, 2000; Zuccari *et al.*, 2001), e na avaliação de processos benignos, como cistos ou abscesso. Por sua vez, o exame histopatológico é o método definitivo para diagnóstico de tumores mamários, pois fornece informações importantes sobre natureza, tipo histológico e infiltração microscópica das células tumorais, inclusive para a cadeia linfática (Cassali, 2000; Cavalcanti, 2006).

Todavia, observa-se grande variação na frequência dos tumores mamários de caráter benigno e maligno em consequência da utilização de diferentes métodos de classificação histopatológica e ausência de critérios homogêneos na diferenciação dos tipos tumorais. Atualmente, a classificação histopatológica mais utilizada para as neoplasias mamárias é a proposta pela Organização Mundial de Saúde (Misdorp *et al.*, 1999). Entretanto, esta classificação ainda não reconhece o padrão micropapilar dentre os subtipos de tumores mamários de cães e gatos (Cassali *et al.*, 2002).

Dentre os tumores mamários malignos, os mais frequentes são os carcinomas (Brodey *et al.*, 1983; Peleteiro, 1994), sendo o carcinoma em tumor misto benigno (CaTMB) o subtipo mais comumente observado (Cassali, 2000; Cavalcanti, 2006; Toríbio, 2008; Damasceno, 2009; Ribeiro *et al.*, 2009). Os CaTMB derivam da transformação maligna de componentes epiteliais do tumor misto benigno. A classificação histológica deste subtipo deve-se basear no pleomorfismo celular e na ruptura da membrana basal com invasão para o estroma (Bertagnolli *et al.*, 2009). A partir da avaliação microscópica das lesões é possível determinar também a graduação histológica. Esse método considera como critérios o índice de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica.

Até o momento, somente a terapia cirúrgica realizada com ampla margem de segurança é a forma de tratamento que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (De Nardi, 2007). O tipo de cirurgia a ser realizado dependerá do tamanho da lesão, da sua localização e da drenagem linfática. Os protocolos com fármacos antineoplásicos geralmente são pouco efetivos quando comparados com a medicina e inclui o 5-fluorouracil, a ciclofosfamida e a doxorubicina (Rutteman *et al.*, 2001). Recentemente Lavalle e colaboradores (2009) relataram maior sobrevida no grupo de cadelas portadoras de carcinomas mamários submetidas à cirurgia seguida do protocolo quimioterápico com carboplatina associada a um inibidor seletivo da COX-2.

Outros métodos alternativos como a radioterapia e a hormonioterapia são pouco utilizados na Medicina Veterinária. A radioterapia é indicada quando a remoção cirúrgica não é possível, no controle da dor local, resultante da compressão tumoral ou ainda para promover a citoredução do tumor em regiões de difícil acesso cirúrgico (De Matos *et al.*, 2006). A presença de receptores para hormônios em tumores mamários de cadelas sugere que a terapia anti-hormonal possa ser uma alternativa para o tratamento nessa espécie, a exemplo do que é feito na medicina humana (Sorenmo, 2003; Tavares *et al.*, 2009). O uso do fármaco tamoxifen (antiestrogênico) como adjuvante na exérese cirúrgica do tumor de mama foi documentado em alguns casos clínicos, entretanto os resultados foram contraditórios, além dos importantes efeitos colaterais observados (Novosad, 2003).

Recentemente, a eletroquimioterapia tem sido proposta para o tratamento de cânceres em animais, consistindo em uma nova modalidade de terapia de controle local para neoplasias sólidas. A administração do agente antineoplásico posteriormente à realização da eletroporação no tumor são os princípios da técnica. Suas principais características são os

efeitos colaterais mínimos, a redução no número de pacientes mutilados e a ausência de resistência das células neoplásicas ao tratamento (Rangel *et al.*, 2008).

Marcadores Prognósticos no câncer de mama

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam entre os pacientes. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial metastático do tumor dentre outros mecanismos, ainda não completamente compreendidos, relacionados com o perfil hormonal, nutricional e imunológico do paciente (Peña *et al.*, 1998; Zucari *et al.*, 2008).

Fator prognóstico pode ser definido como uma ou várias características clínicas, patológicas e biológicas específicas dos indivíduos e de seus tumores que permitem prever a evolução clínica e o tempo de sobrevida do paciente, sem que o mesmo tenha sido submetido a terapias adicionais e adjuvantes após a cirurgia inicial (Allred *et al.*, 1998; Cavalcanti e Cassali, 2006). Por outro lado, a avaliação dos marcadores preditivos permite selecionar pacientes para tratamentos específicos e individualizados (Marinho *et al.*, 2008). Atualmente, os oncologistas veterinários buscam conhecer não somente a variante histológica do tumor, mas também outros fatores prognósticos que possam ser incorporados à rotina (Ferreira *et al.*, 2009), pois o conhecimento destes marcadores é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos.

Clark (1996) define três situações clínicas em que os fatores prognósticos podem ser úteis: a primeira é aquela cujo prognóstico do paciente é tão bom que nenhum tratamento adjuvante à exérese cirúrgica seria capaz de agregar algum benefício; a segunda é a identificação de pacientes que possuem um prognóstico tão desfavorável com o tratamento convencional que outros tratamentos mais agressivos deveriam ser instituídos; e a terceira, extremamente útil e eficiente, indica quais pacientes serão ou não prováveis beneficiários de uma determinada terapêutica específica.

Ao avaliar o prognóstico de animais portadores de tumores malignos da mama, segundo o sistema TNM de classificação, fica evidente que cadelas com estadiamento avançado possuem pior prognóstico. A maioria dos estudos afirma que o tamanho tumoral pode ser considerado um fator prognóstico independente no câncer de mama de cadelas. Esse

parâmetro tem a vantagem de ser facilmente obtido e deve ser considerado na decisão de terapias complementares (Sorenmo, 2003; Cavalcanti, 2006; Ferreira et al 2009). Cadelas portadoras de neoplasias mamárias acima de cinco centímetros (T3) apresentam menor tempo de sobrevida global e conseqüentemente pior prognóstico (Yamagami *et al.*, 1996; Perez Alenza *et al.*, 1998; Philibert *et al.*, 2003). Além disso, Ferreira *et al.* (2009) verificaram que a maioria das lesões tumorais acima de cinco centímetros (T3) é maligna e apresenta índice de proliferação mais elevado e menor positividade para receptores de progesterona (RP), indicando independência hormonal e maior agressividade quando comparados com tumores menores (T1 e T2),

Animais linfonodo-positivos (estadio IV) têm uma expectativa de vida menor do que os animais linfonodo-negativos e as cadelas com metástases à distância (estadio V) têm o prognóstico ainda pior do que aquelas com envolvimento linfático apenas (Yamagami *et al.*, 1996). Philibert et al. (2003), observaram que cadelas incluídas no estadio I da doença, tinham maior tempo de sobrevida global, em média 24 meses, quando comparadas aos animais inseridos nos estadios II, III, IV, com 12, 15 e 19 meses de sobrevida respectivamente. Utilizando a análise multivariada, estes autores verificaram que estadios avançados e a presença de doença sistêmica reduzem o tempo de sobrevida dos animais.

Todavia, independente do tamanho tumoral, é imprescindível a realização do exame anatomohistopatológico de todos os nódulos. A classificação histológica tem valor estabelecido pela sua importância em prever o comportamento biológico do tumor (Bostock, 1986), além de fornecer informações adicionais importantes para o clínico definir o prognóstico e escolher o melhor plano terapêutico a ser instituído para o paciente (Werner e Werner, 2009).

A graduação histológica, assim como o tamanho tumoral, tem sido considerada um indicador prognóstico independente no câncer primário de mama tanto na mulher quanto na cadela (Cavalcanti, 2006). Esse parâmetro tem como objetivo avaliar o grau de diferenciação e proliferação da neoplasia e as variações morfológicas do núcleo, apresentando importante correlação com agressividade (Elston e Ellis, 1991).

Marcadores moleculares também estão sendo avaliados como fontes de informações para o prognóstico e para prever o comportamento de vários tipos de cânceres em humanos e animais (Marinho *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009). Receptores hormonais (receptor de

estrógeno – RE e receptor de progesterona – RP), COX-2 e o marcador do índice proliferativo do tumor (MIB-1) são marcadores muito valiosos na avaliação complementar do câncer de mama e devem ser incorporados à rotina em medicina veterinária (Zucari *et al.*, 2008). Além disso, estes marcadores estão associados à indicação de protocolos terapêuticos específicos e, desta forma, são considerados também fatores preditivos (Martin *et al.*, 1984).

Na cadela, é elevada a proporção de tumores benignos da mama positivos para receptores de estrógeno e progesterona. Ao contrário, apenas uma parte das neoplasias malignas apresenta esses receptores e em concentrações menores (Cassali, 2000), pois com a progressão do tumor e o aumento da malignidade ocorre redução da dependência hormonal e maior autonomia das células neoplásicas (Geraldine *et al.*, 2000). Segundo Martin e colaboradores (1984), cadelas que apresentam carcinomas com positividade para receptores hormonais possuem maior sobrevida, além de serem candidatas a hormonioterapia.

A enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) apresenta-se como um marcador potencial para o câncer de mama, uma vez que é expressa em resposta a processos inflamatórios, que frequentemente acompanham as neoplasias e alteram o seu prognóstico (Grudzinski *et al.*, 2006; De Nardi, 2007). A expressão da COX-2 é mais freqüente e intensa nas células epiteliais dos tumores malignos, sugerindo uma ação potencial da COX-2 na carcinogênese mamária da cadela (Doré *et al.*, 2003; Heller *et al.*, 2005; Millanta *et al.*, 2006; De Nardi, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009), a semelhança do que tem sido observado em mulheres (Kelly *et al.*, 2003; Grudzinski *et al.*, 2006). Lavalle *et al.* (2009) observaram que a maior expressão de COX-2 foi relacionada com um pior prognóstico e menor tempo de sobrevida, sugerindo que o uso de inibidores de COX-2 pode ser uma alternativa no tratamento e controle da doença neoplásica na mama em caninos.

Em cadelas, foram observados resultados similares aos descritos na mulher, tanto pela maior expressão do MIB-1 (marcador imunistoquímico de proliferação celular) nos tumores malignos da mama, principalmente naqueles menos diferenciados, quanto pela correlação inversa com a imunomarcagem para o receptor para progesterona (Cassali, 2000). O marcador de angiogênese (CD31), o fator de crescimento epidérmico (EGF), as moléculas de adesão (E-caderina e β -catenina), o Her-2 e o p53, são outros exemplos de marcadores prognósticos importantes avaliados nos tumores mamários caninos pela técnica imunistoquímica (Macewen *et al.*, 1982; Cassali, 2000; Zuccari *et al.*, 2004; De Nardi *et al.*, 2007; Terzian *et*

al., 2007; Laufer-Amorim *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008; Zuccari *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Lavallo *et al.*, 2009; Ribeiro, 2009).

Com o avanço da biologia molecular surgem novas perspectivas, a partir da análise da expressão gênica de neoplasias, visando a prevenção, o diagnóstico precoce e a adoção de tratamentos mais eficazes (Cassali *et al.*, 2007). A análise de microarranjos de cDNA (em inglês *microarray*) possibilita a identificação de diferentes subtipos de câncer de mama, a partir da avaliação simultânea de milhares de genes. Outra técnica que vem sendo difundida é o microarranjo de tecidos (*tissue microarray*, TMA), onde é possível avaliar um único gene, porém em um grande número de amostras tumorais, acelerando estudos que buscam associações entre as variações moleculares e os aspectos clínico-patológicos (Cassali *et al.*, 2008). Entretanto, o emprego dessas tecnologias ainda não faz parte da rotina dos laboratórios veterinários.

Atualmente, três testes prognósticos foram validados para o câncer de mama na mulher e estão comercialmente disponíveis: o Oncotype DX (*Genomic Health, Redwood City, California*), o *MammaPrint* (*Agendia BV, Amsterdam, Netherlands*), e o H/I (*AvariaDX, Carlsbad, California*). Estudos iniciais confirmam a capacidade discriminatória prognóstica de tais testes, que representam a introdução de novas tecnologias, baseadas na expressão gênica e na aplicação clínica oncológica (Cassali *et al.*, 2008).

Outro fator importante envolvido na agressividade tumoral é a resposta inflamatória associada ao tumor. Estudos histológicos, imunoistoquímicos e de citometria de fluxo demonstram que os carcinomas mamários da mulher são efetivamente infiltrados por diferentes tipos de leucócitos, predominantemente macrófagos e linfócitos, sendo estes últimos representados principalmente por células T (Whitford *et al.*, 1990; Aaltomaa *et al.*, 1992; Camp *et al.*, 1996; Sica *et al.*, 2008; Whiteside, 2008; Liyanage *et al.*, 2010). Os linfócitos T desempenham importantes funções imunomoduladoras e alguns estudos têm sugerido que a identificação das subpopulação de células T (CD4⁺ e CD8⁺), bem como, das citocinas, fornecem um método sensível e eficaz para avaliar a imunidade celular e auxiliar no prognóstico em pacientes com cancer de mama (Campbel *et al.*, 2005; Matkowski *et al.*, 2009).

Análises multivariadas realizadas em um estudo com pacientes portadoras de tumores mamários mostraram que uma maior reação estromal linfocítica é o fator mais fortemente relacionado à recorrência tumoral em mulheres jovens (Stewart e Heppner, 1997), pois a

presença de células inflamatórias nos tumores tem relação direta com uma resposta imunológica incapaz de evitar o desenvolvimento tumoral (Sheu *et al.*, 1999; Machetti *et al.*, 2006; Murri *et al.*, 2008). Entretanto, em tumores de crescimento rápido a presença de linfócitos T, tem sido proposta como um interessante indicador prognóstico quando comparado com tumores não imunogênicos, apresentando correlação positiva com a ausência de metástase nos linfonodos, menor tamanho tumoral, menor graduação histológica e maior tempo de sobrevida livre da doença (Aaltomaa *et al.*, 1992; DeNardo e Coussens, 2007).

Em cães, a relação entre a infiltração de linfócitos intratumorais e o prognóstico é bem estabelecida para o melanoma, sendo tradicionalmente descrito em laudos histopatológicos (Clark *et al.*, 1989) e recentemente esta caracterização da resposta inflamatória foi também estendida a outros tumores. Nowak *et al.* (2007) descreveram a correlação entre o número de células CD8⁺ com o potencial metastático dos adenocarcinomas mamários da cadela.

Na medicina Pag e colaboradores (2009) propuseram um escore imunológico, com base no tipo, densidade e localização do infiltrado linfocitário como um novo fator prognóstico capaz de prever a sobrevida livre da doença e auxiliar nas decisões sobre o tratamento adjuvante em pacientes com câncer de mama. Além disso a presença de linfócitos associados ao tumor tem sido proposta como fator preditivo independente na avaliação do tratamento quimioterápico em mulheres com câncer de mama (Murta *et al.*, 2000; Denkert *et al.*, 2010). Desta forma, diante da frequente associação entre células inflamatórias e tumores mamários na cadela, a análise dos linfócitos infiltrantes no tumor ou presentes no sangue periférico se apresentam como potenciais biomarcadores na avaliação do prognóstico e da sobrevida.

Capítulo II: Sistema Imune e Câncer

Aspectos Gerais

O sistema imune é constituído por uma complexa rede de sinais químicos e tipos celulares que são capazes de responder prontamente a várias alterações na homeostase do organismo (Ono, 2008). A função fisiológica do sistema imunológico é a defesa contra substâncias estranhas, incluindo microorganismos, macromoléculas, bem como, reconhecer e combater clones de células alteradas antes que formações neoplásicas se iniciem (Abbas e Lichtman, 2005). As suas atividades são executadas por células denominadas de leucócitos, as quais atuam em diferentes momentos da resposta imune e respondem a estímulos distintos (Ferreira, 2008).

A evolução tumoral é composta pelas seguintes fases: *in situ*, crescimento, invasão, extravasamento e metástase. Durante essas fases, as células tumorais interagem com o seu microambiente e são influenciadas por sinais provenientes de células estromais, endoteliais, inflamatórias e imunológicas, os quais podem contribuir, simultaneamente, para o processo inflamatório e para a resposta imune anti-tumoral (Yaquub e Aandah, 2009).

No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o papel do sistema imune no controle do crescimento de tumores, porém o estágio de desenvolvimento experimental da imunologia naquele período não permitiu a comprovação científica da hipótese (Torrenzine e Athanaziou, 2007). Em 1950, foi originalmente proposto o conceito de imunovigilância como a capacidade do sistema imune em reconhecer e inibir clones de células transformadas antes de se transformarem em tumores e a habilidade para destruir os tumores depois que os mesmos já estão formados (Carneiro e Prado, 1998; Malmberg, 2004).

Apesar da importância da vigilância imunológica na gênese tumoral, o caráter antigênico dos tumores pode ser variável ou, ainda, questionável, visto que as neoplasias quando desenvolvidas, geralmente, não são reconhecidas e eliminadas eficientemente pelo sistema imune (Withrow e MacEwen, 2001). Desta forma, no intuito de melhor caracterizar a relação entre a resposta imunológica contra os tumores, avanços recentes no campo da imunologia básica acrescentaram o conceito complementar da imunoedição, no qual a pressão seletiva do sistema imune molda o perfil antigênico dos tumores (Torrenzine e Athanaziou, 2007).

A imunoeedição envolve a seleção de mecanismos de evasão pelas células tumorais, permitindo o seu crescimento até o estágio clinicamente detectável, sendo este processo constituído por três fases. Inicialmente, o sistema imune reconhece as células transformadas e recruta moléculas pró-inflamatórias, caracterizando o processo de eliminação. Em um segundo momento, as células tumorais selecionadas que não foram destruídas geram variantes que carregam mutações possibilitando a resistência. Segue-se uma fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual coexistem as células de baixa imunogenicidade que compõem o tumor e as células e moléculas responsáveis pelo controle do crescimento das mesmas. Por fim, após esta seleção natural as células tumorais se desenvolvem em um ambiente virtualmente anérgico (fase de evasão) (Dunn *et al.*, 2002).

O sistema imune é capaz de responder ao câncer com ativação sistêmica, regional e intratumoral de leucócitos (Whiteside, 2008). O combate efetivo das células tumorais depende basicamente da geração *in vivo* de número suficiente de células imunes com grande capacidade de reconhecimento de antígenos tumorais; da migração e infiltração destas células no estroma tumoral; e da ativação das células imunes no microambiente tumoral resultando em mecanismos efetores apropriados (Rosenberg *et al.*, 2004).

As respostas imunes inata e adaptativa formam um sistema integrado de defesas do hospedeiro, no qual diversas células e moléculas funcionam cooperativamente (Male *et al.*, 2006). A imunidade inata é considerada a primeira linha do mecanismo de defesa e envolve uma ampla variedade de células, fatores humorais e respostas tissulares, entretanto é inespecífica ao antígeno e não apresenta memória (Snyder, 2009). A resposta inata contra os tumores tem como principal via efetora as células NK (*natural killers*), linfócitos granulares assim denominados por eliminar células tumorais *in vitro* sem a necessidade de estímulos ou sensibilização prévia (Whiteside e Herberman, 1995).

A função citotóxica das células NK ocorre pela liberação de grânulos de perforina e granzimas, que lisam as células-alvo. Perforinas e granzimas são também mediadores pré-formados armazenados em grânulos nos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Zisman *et al.*, 2000; Torrezine e Athanaziou, 2007). As perforinas são capazes de formar poros transmembrana na célula-alvo, que permitem a entrada de outras moléculas efetoras como as granzimas, ou de água, causando a lise por osmose, ativando proteínas intracelulares (caspases) e induzindo apoptose (Abbas e Lichtman, 2005).

A ativação das células NK depende do equilíbrio entre os sinais estimulantes e inibitórios dos seus receptores (Abbas e Lichtman, 2005). Estas células respondem principalmente na ausência de moléculas de MHC classe I porque o reconhecimento dessas moléculas fornece sinais inibitórios. As células somáticas normais não são alvos das NK, pois os sinais inibitórios provenientes das moléculas normais de MHC classe I superam os sinais de ativação. Nas células tumorais, a expressão reduzida ou alterada das moléculas do MHC interrompe os sinais inibitórios, permitindo a ativação das células NK e a morte das células-alvo (Moretta *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2010). Os receptores de inibição, denominados KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*), reconhecem grupos de alelos do MHC classe I, sendo que diferentes células NK reconhecem diferentes alelos do MHC I (Orr e Lannier, 2010).

Assim, o papel aparente das células NK é de detectar as células alteradas, quando estas tentam evadir o sistema imune, não sendo reconhecidas pelas células T CD8⁺. Desta forma, a existência das células NK não permite que a queda da expressão de MHC classe I possa ser usada como mecanismo de escape de células tumorais (Moretta *et al.*, 2002). Entretanto, a ausência de sinais inibitórios não é suficiente para que ocorra a destruição via célula NK, sendo necessária a combinação da ligação de receptores estimulantes com o desligamento de receptores inibitórios (Torrezine e Athanaziou, 2007).

A resposta adaptativa é a segunda linha de defesa sendo caracterizada pela especificidade aos antígenos, diversidade, memória e reconhecimento de moléculas estranhas pelo organismo (Male *et al.*, 2006). Os tumores expressam antígenos que são capazes de induzir uma resposta imune específica celular e/ou humoral, entretanto a maioria dos tumores é fracamente imunogênica e as respostas com frequência não previnem o crescimento de tumores (Snyder, 2009).

O principal mecanismo da resposta imune adaptativa contra as células tumorais é a ação direta das células T CD8⁺ citotóxicas que reconhecem antígenos tumorais apresentados ao MHC classe I. Estes antígenos derivados de tumores também podem ser processados e apresentados às moléculas do MHC de classe II na superfície das células dendríticas (DC) e induzem a proliferação das células T auxiliares (Huttner *et al.*, 2005).

Entretanto, o papel dos mecanismos imunes efetores na proteção de indivíduos contra tumores não está bem definido. Aparentemente, a efetividade do sistema imune ao tumor é determinada pelo tipo de resposta obtida (Whiteside, 2008). Durante a resposta inflamatória

aguda, observam-se predominantemente células Th1, linfócitos T e NK. Os linfócitos secretam citocinas antitumorais, que combinadas com antiglobulinas produzidas por linfócitos B, ativam a resposta inibitória e recrutam células imunes e linfócitos citotóxicos que promovem a regressão tumoral (Nizar *et al.*, 2009; Flavell *et al.*, 2010). Em contrapartida, a ativação crônica da resposta imune resulta no acúmulo de linfócitos T reguladores (Tregs), de células Th2 e ativação de células B, ocasionando desenvolvimento e na progressão tumoral. Estes dados indicam que os linfócitos B e os fatores que estão presentes no soro são essenciais para o estabelecimento de processos inflamatórios crônicos que estão associados com a progressão das lesões pré-malignas (Visser *et al.*, 2006).

Os tumores podem evadir as respostas imunes por meio de vários mecanismos, como exemplo: a) a sub-regulação da expressão de moléculas do MHC ou de qualquer componente envolvido nas etapas de processamento de antígenos e transporte de epítomos imunogênicos para a membrana plasmática; b) a falta de moléculas co-estimulatórias nas células tumorais; c) a seleção de células que não expressam antígenos tumorais; d) a produção de substâncias imunossupressoras, a exemplo do fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) secretado em grandes quantidades por muitos tumores e que inibe uma ampla variedade de funções dos linfócitos e macrófagos; e) a indução de disfunção das células T seja por aumento da taxa apoptótica, diminuição da proliferação ou alterações na transdução de sinais; f) a redução na produção de citocinas, induzindo a tolerância a antígenos tumorais; g) e predomínio de células T reguladoras (Ichihara *et al.*, 2003; Rodriguez-Lecompte *et al.*, 2004).

Alguns antígenos tumorais podem induzir a tolerância imunológica específica. Tolerância é a ausência de resposta do sistema imune adaptativo a antígenos, como resultado da inativação ou morte de linfócitos específicos, induzida pela exposição aos antígenos (Snyder, 2009). A tolerância pode ocorrer porque os antígenos tumorais são próprios e encontrados pelo sistema imune em desenvolvimento ou porque as células tumorais apresentam seus antígenos em uma forma tolerogênica para linfócitos maduros (Abbas e Lichtman, 2005).

A tolerância é mantida por inúmeros mecanismos incluindo deleção, anergia e supressão. A deleção também referida como autotolerância, é o processo de eliminação por apoptose dos clones de linfócitos autorreativos através da sinalização do Fas-Fas ligante. A anergia é a inativação funcional dos linfócitos que encontram o antígeno e a supressão ocorre a partir da ativação das células T reguladoras que previne as reações imunes contra os antígenos próprios (Male *et al.*, 2006).

Existe uma forte relação entre as células T regulatórias (Tregs), o desenvolvimento e a progressão do câncer. Cada vez mais, evidências sugerem que as Tregs podem impedir uma potencial e efetiva resposta imune contra o tumor, sendo associado desta forma a um pior prognóstico (Nizar *et al.*, 2009). O mecanismo da imunossupressão não está claro, contudo, as Tregs possuem a habilidade de inibir linfócitos CD4⁺CD25⁻, linfócitos CD8⁺, células dendríticas e células B a partir do contato célula a célula (DeNardo e Coussen, 2007).

O aumento da população de células T reguladoras tem sido relatado no sangue periférico, linfonodos regionais e ambiente tumoral de pacientes com câncer de pulmão, pâncreas, ovário e mama (Ichihara *et al.*, 2003; Liyanage *et al.*, 2010). O sangue periférico de pacientes humanos com câncer gástrico apresenta simultaneamente, aumento na taxa apoptótica das células T, principalmente CD8⁺, com elevação da atividade da caspase-3, redução no número de receptores ζ de células T e produção inadequada de citocinas (Takahashi *et al.*, 2001).

Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos no crescimento tumoral, bem como a resposta imune contra o tumor, são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente para as formas mais avançadas da doença para as quais as opções atuais de tratamento têm impacto limitado na sua progressão (Torrezine e Athanaziou, 2007)

Inflamação e Câncer

Um novo paradigma amplamente aceito, atualmente, é de que a inflamação crônica associada ao tumor é dirigida, em parte, por citocinas e quimiocinas presentes no ambiente tumoral, que facilitam a progressão das células neoplásicas, em vez de promover uma resposta imune efetiva (Marx, 2004; Whiteside, 2008). O sistema imune é capaz de responder ao câncer a partir da ativação sistêmica, regional e intratumoral de leucócitos (Wong *et al.*, 1998). Além disso, células tumorais e do estroma reativo secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que atuam direta ou indiretamente estimulando o endotélio vascular a recrutar leucócitos para o sítio tumoral (Nicolini *et al.*, 2006).

Após ativação, esses leucócitos associados ao tumor liberam fatores angiogênicos, mitogênicos, enzimas proteolíticas e fatores quimiotáticos, recrutando mais células inflamatórias e estimulando a angiogênese e linfangiogênese, o que sustenta o crescimento,

disseminação e evasão tumoral (Bem-Baruch, 2003; DeNardo e Coussen, 2007). A expressão aumentada, assim como, concentrações elevadas de citocinas provavelmente contribua para o crescimento e progressão tumoral, via imunomodulação (Yoo *et al.*, 2009).

O processo inflamatório associado ao desenvolvimento neoplásico foi identificado pela primeira vez há mais de um século e envolve uma complexa resposta do hospedeiro, apresentando aspectos protetores e também pró-tumorais (Snyder, 2009). Esta resposta inclui o recrutamento de células do sistema imune inato e adaptativo, mediadores inflamatórios e a interação entre citocinas e receptores (Thun *et al.*, 2004; Whiteside, 2007).

Inicialmente, postulava-se que a presença do infiltrado inflamatório no sítio tumoral seria a prova da atividade imune contra o crescimento neoplásico (Whiteside, 2008). Entretanto, acredita-se que em determinadas situações, as células responsáveis pela modulação da resposta inflamatória liberam fatores autócrinos e parácrinos que estimulam a proliferação celular e a angiogênese e inibem a apoptose, alterando a resposta do sistema imune a agressão (Coussen e Werb, 2001; Marx, 2004). Esses fatores em conjunto podem acelerar a mutagênese, promovendo a sobrevivência de clones celulares atípicos com maior capacidade de invasão (Thun *et al.*, 2004). Atualmente, alguns pesquisadores estimam que a inflamação contribua para o desenvolvimento de no mínimo 15% de todos os cânceres (Coussens e Werb, 2001; Ono, 2008).

A dinâmica interação entre as células malignas do estroma local, a resposta inflamatória e a resposta imune adaptativa é complexa e, vários processos opostos tendem a ocorrer simultaneamente ou em seqüência. A inflamação também contribui para um microambiente favorável para o crescimento do tumor, a partir da promoção da angiogênese e da degeneração do estroma para o aumento da invasividade consequentemente do potencial metastático das células tumorais (De Visser *et al.*, 2006) Paradoxalmente, o microambiente tumoral é altamente imunossupressor e protege efetivamente o tumor de uma resposta imunológica antitumoral adaptativa (Yaqub and Aandah, 2009).

Um potencial indicador do envolvimento da resposta imune no câncer é a extensão do infiltrado inflamatório no sítio tumoral (Stewart e Heppner, 1997). Foi observado que a medida que o câncer de mama progride ocorre um aumento no número de leucócitos na periferia tumoral, tanto de origem linfóide quanto mielóide (Camp *et al.*, 1996). Os mecanismos propostos pelos quais a resposta imune pode promover o desenvolvimento do

câncer incluem a infiltração de células imunes e a produção e ação de citocinas, quimiocinas, proteases, espécies reativas de oxigênio e histamina, que aumentam a remodelação do tumor e a angiogênese (Yan *et al.*, 2006).

Estudos com histologia e citometria de fluxo têm demonstrado que as neoplasias mamárias em mulheres são infiltradas por uma população heterogênea de células imunes, constituídas de diferentes proporções de linfócitos T, linfócitos B, células NK e macrófagos (Aaltomaa *et al.*, 1992; Camp *et al.*, 1996). Kim e colaboradores (2010) observaram que os tumores mamários malignos em cadelas são caracterizados por marcante infiltração de mononucleares, particularmente linfócitos presentes no estroma, ao redor de vasos e células neoplásicas. Ao contrário, linfócitos são raramente observados na glândula mamária normal e em tumores benignos da mama.

Estas células inflamatórias recrutadas são capazes de expressar fatores favoráveis a carcinogênese, bem como citocinas inflamatórias (TNF- α) que aumentam a expressão das quimiocinas, as quais podem estimular a quimiotaxia de células inflamatórias, a exemplo dos monócitos, resultando num “ciclo vicioso” de infiltração (Ben-Baruch, 2003). Aparentemente, o tipo, a intensidade e o momento do início da resposta inflamatória induzida pela ação de citocinas, são fatores que definem se o processo inflamatório atuará como promotor ou inibidor do desenvolvimento tumoral (Blankenstein, 2004).

O macrófago, presente no tecido afetado, é o primeiro tipo celular a responder ao estímulo neoplásico (Ben-Baruch, 2003; Mantovani, 2007), atuando ainda, a partir da síntese de quimiocinas, como sinalizador para o recrutamento de outras células inflamatórias, como neutrófilos e mastócitos (Lin e Pollard, 2004). Os macrófagos são células pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear que derivam de monócitos circulantes (Yu e Rak, 2003). Estas células migram para os tecidos onde sofrerão diferenciação em dois tipos celulares, M1 e M2, com distintas funções. Os macrófagos M1, ativados pelo interferon gama INF- γ , são potentes células efectoras no combate aos tumores, ao contrário dos macrófagos M2 que promovem a proliferação a partir da produção de fatores de crescimento relacionados à angiogênese, reparo e remodelagem tecidual (Mantovani, 2007; Sica *et al.*, 2008).

Macrófagos presentes no microambiente tumoral tendem a piorar o prognóstico em 80% dos casos. Estudos mostram que as células tumorais invadem os vasos sanguíneos em associação com os macrófagos, possivelmente através da ação de metaloproteinases, que degradam a

matriz extracelular (Sica et al., 2008). Além disso, os macrófagos influenciam a angiogênese que mantém a nutrição das células tumorais, favorecendo seu crescimento e desenvolvimento. Estas interações servem de base teórica para algumas estratégias de prevenção farmacológica e terapia adjuvante com inibidores de cicloxigenases (Torrezine e Athanazio, 2008).

Acredita-se que os monócitos são recrutados para área tumoral pelo CSF-1, fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), proteína quimioatrativa de monócito-1 (MCP-1), dentre outras quimiocinas. Esta interação de monócitos/macrófagos com células tumorais pode promover novo recrutamento e ativação de macrófagos associados ao tumor (Stewart e Heppner, 1997; Knowles *et al.*, 2004; Ono, 2008).

Os macrófagos ativados, por sua vez, produzem importantes citocinas (TNF- α , IFN- α , TGF- β , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18) e o fator de transcrição NF- κ B (Coussens e Werb, 2001; Lin e Pollard, 2004; Aspod *et al.*, 2007. Yoo, et al., 2009). O NF- κ B tem sido associado à promoção de mudanças celulares, levando a proliferação das células tumorais e a intermediação na liberação de células metastáticas pelo tumor primário (Marx, 2004). Além disso, macrófagos são responsáveis por induzir a proliferação das células T auxiliares, através da apresentação dos antígenos tumorais ligados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, promovendo uma resposta imune adaptativa (Abbas e Lichtman, 2005).

A ativação e a inibição de células T dependem da presença ou ausência de citocinas em seu microambiente. Aparentemente, existe um ciclo de alimentação entre macrófagos e linfócitos importante para o desenvolvimento ou inibição do desenvolvimento tumoral (Denardo e Coussens, 2007). Em um estudo realizado por Damasceno (2009), a partir da análise morfológica e morfométrica do infiltrado inflamatório associado aos carcinomas mamários de cadelas, foi observado predomínio de linfócitos nos tumores mais agressivos enquanto o infiltrado histiocitário apresentou correlação com tumores de melhor prognóstico.

Alguns estudos relatam que os carcinomas mamários em mulheres são infiltrados por linfócitos, predominantemente linfócitos T, e que sua presença está relacionada a um melhor prognóstico por inibir a angiogênese e conter o crescimento neoplásico (Camp *et al.*, 1996). No entanto, atualmente tanto os estudos que utilizam modelos experimentais quanto aqueles que usam tumores mamários espontâneos na mulher, apóiam a hipótese de que a inflamação

desempenha um papel na promoção do câncer de mama (Stewart e Heppner, 1997; Thum *et al.*, 2004; Lin e Karen, 2007).

No câncer de mama de mulheres, a infiltração de células T é mais extensa nos carcinomas ductais *in situ* de alto grau e carcinomas invasivos (Wong *et al.*, 1998), enquanto os linfócitos B são maioria durante os estádios mais precoces do câncer de mama (Whiteside, 2008). Linfócitos B também são reconhecidos por contribuir para uma resposta imune anti-tumoral via secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas (Whiteside, 2007). Está claro que a ativação aguda de células B tem importância na destruição de células neoplásicas jovens, ou na regressão espontânea de tumores mediados por imunoglobulinas. Todavia, estudos indicam que a ativação crônica deste tipo celular pode, arbitrariamente, potencializar o desenvolvimento do carcinoma mamário por mecanismos ainda pouco elucidados (Denardo e Coussens, 2007).

Os plasmócitos também estão presentes na resposta inflamatória associada às neoplasias mamárias e são originados de células B (Whiteside, 2008). Na mulher, a presença destas células infiltrando os carcinomas ductal e lobular da mama foi associada a um pior prognóstico por Stewart e Heppner (1997). Na literatura existem poucas evidências da existência de imunidade humoral efetiva contra tumores. Contudo, a difusa infiltração plasmocítica é frequentemente relatada na periferia dos carcinomas mamários indiferenciados de cadelas (Misdorp *et al.*, 1999).

Linfócitos x Câncer de mama

Linfócitos são células móveis que circulam continuamente entre o sangue e o tecido, retornando para o sangue através do sistema linfático (Snyder, 2009) Estas células são as únicas capazes de reconhecer antígenos específicos, sendo conseqüentemente, as principais células da resposta imune adquirida. Esses leucócitos possuem receptores altamente especializados capazes de detectar e destruir antígenos, possibilitando a manutenção do equilíbrio do meio interno do organismo (Male *et al.*, 2006).

O percentual de linfócitos totais é obtido pelo somatório dos linfócitos B, linfócitos T e células NK. Entretanto, o número de células NK é considerado muito baixo nos infiltrados tumorais (Whiteside e Herberman, 1995). Os linfócitos B apresentam como principal função a

produção de anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares e se diferenciam em células secretoras de anticorpos (plasmócitos), funcionando assim, como mediadores da imunidade humoral (Abbas e Lichtman, 2005).

Os linfócitos T são os principais constituintes da resposta imune celular e, têm por objetivo reconhecer e destruir antígenos de microrganismos intracelulares e de células tumorais. As células T apresentam especificidade restrita para antígenos, reconhecendo apenas aqueles apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e que se expressam na superfície de outras células (Snyder, 2009).

Os linfócitos T possuem subpopulações funcionalmente distintas, as células T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos (CTLs). Em resposta à estimulação antigênica, as células T auxiliares secretam proteínas denominadas citocinas, cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como de outras células, incluindo as células B, os macrófagos e outros leucócitos (Male *et al.*, 2006). Os CTLs destroem as células que produzem antígenos estranhos, como células infectadas por vírus e células tumorais. Existem ainda as células T reguladoras que apresentam como principal função a inibição de respostas imunológicas. Outra classe de linfócitos é representada pela célula *natural killer* (NK), a qual apresenta função importante na imunidade natural contra vírus e alguns organismos extracelulares e principalmente contra células tumorais (Orr e Lanier *et al.*, 2010).

A maioria dos leucócitos infiltrantes no tumor é representada por linfócitos T e alguns estudos afirmam que infiltrados linfocíticos mais intensos estão correlacionados com prognóstico favorável. No entanto, a composição de linfócitos T no infiltrado tumoral é variável e pode afetar a progressão da doença e a sobrevida global do paciente (Ben-Baruch, 2003; Leong *et al.*, 2006; Machetti *et al.*, 2006; Denardo e Coussen, 2007; Sheu *et al.*, 2008). A relação entre a infiltração de linfócitos intratumorais e o prognóstico é bem estabelecida para o melanoma, sendo tradicionalmente, um fator descrito nos laudos anatomopatológicos (Clark *et al.*, 1989). Recentemente, esta observação foi estendida a outros tumores, inclusive os carcinomas mamários da mulher (Torrezine e Athanaziou, 2007).

Camp e colaboradores (1996), usando a imunoistoquímica, avaliaram fenotipicamente o infiltrado inflamatório nos tumores malignos da mama *in situ*. Os resultados demonstraram que 90% dos tumores malignos apresentam infiltrado de linfócito T. Estes produzem citocinas imunossupressivas que possivelmente, inibem o estabelecimento de uma resposta imune

efetiva. Por outro lado, trabalhos demonstram que a resposta linfocítica é responsável por conter o avanço do carcinoma mamário (Ben-Baruch, 2003, Denardo e Coussen, 2007).

Tem sido reportado que linfócitos localizados na periferia do tumor de mama são capazes de converter a androstenediona em estrona, a partir da ativação de enzimas envolvidas na síntese do estrógeno ou de citocinas que afetam a atividade destas enzimas, contribuindo assim, para a proliferação neoplásica (Stewart e Heppner, 1997). Como se percebe não existe consenso quanto à eficácia da resposta antitumoral mediada por linfócitos, nem mesmo sobre a subpopulação predominante (Whiteside *et al.*, 1986, Camp *et al.*, 1996, Ben-Baruch, 2003; De Visser, 2006).

Linfócitos T infiltrados no tumor expressam marcadores efetores e regulatórios (Whiteside, 2008). Nos linfócitos CD4⁺ os dois marcadores estão presentes, enquanto no CD8⁺ o componente efetor é predominante e correlaciona-se com a baixa incidência de metástase (Leong *et al.*, 2006). Os linfócitos T citotóxicos destroem as células tumorais desencadeando o mecanismo de apoptose e impedindo o crescimento tumoral. Evidências sugerem que o tipo, a densidade e a localização dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ podem influenciar no prognóstico (Westermann e Pabst, 1990; Matkowski *et al.*, 2009).

Células T CD4⁺ desempenham um papel decisivo no estabelecimento da resposta imune anti-tumoral específica, pois podem mediar a partir da produção de diferentes citocinas, mecanismos efetores envolvidos no controle e na progressão da neoplasia (Hung *et al.*, 1998). Os linfócitos T auxiliares, que expressam moléculas CD4⁺ em sua superfície, reconhecem peptídeos antigênicos nas células apresentadoras de antígenos (APC) e, uma vez ativados promovem conexões imunológicas entre eventos da imunidade humoral, via interação T/B, da imunidade celular inata (via macrófagos e células dendríticas) e adaptativa (via células T CD8⁺) (Forman, 1984).

Acredita-se que as células T CD4⁺ não sejam necessariamente indutoras, mas que podem atuar amplificando a resposta citotóxica nos tumores (Hung *et al.*, 1998). Os linfócitos CD4⁺ produzem INF γ e GM-CSF que inibem a angiogênese induzida pelas células tumorais, e até mesmo ativando macrófagos do tipo M1, que dentre os mecanismos de defesa incluem a liberação de enzima lisossomais, os intermediários reativos do oxigênio e o óxido nítrico (Mantovani *et al.*, 2008).

Entretanto, alguns autores sugerem que a predominância de linfócitos CD4⁺ no sítio tumoral seja capaz de “controlar” a expressão dos linfócitos CD8⁺, conseqüentemente prejudicando a resposta antitumoral efetiva (Sheu *et al.*, 2008). Da mesma forma, a redução do percentual de infiltração de células T CD4⁺ no tumor, bem como o aumento da infiltração isolada de CD8⁺, com alteração da relação CD4⁺ /CD8⁺ pode implicar em resposta anti-tumoral insuficiente e fraca. A ativação de ambos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, em proporções adequadas conduzem a uma resposta imune eficiente que resulta na destruição das células tumorais (Sheu *et al.*, 1999; Whiteside 2007).

Rubbert *et al.* (1991) demonstraram a diminuição das células T CD8⁺ em linfonodos regionais de pacientes com câncer de mama, principalmente naqueles com metástase, indicando que há uma supressão de células NK e linfócitos, resultando em uma pior atividade imunológica. Por outro lado Matkowski *et al.* (2009) observaram uma forte correlação entre a expressão de CD4⁺ e CD8⁺ e a presença de metástase linfática em mulheres com carcinoma mamário.

Campbell e colaboradores (1996) mensuraram o perfil de citocinas intracelulares dos linfócitos T no sangue periférico de 85 mulheres com câncer de mama e correlacionaram os níveis de citocinas com a presença de micrometástases em linfonodo e medula óssea. O percentual de CD4⁺ e CD8⁺ produzindo citocinas tipo 1 (Th1) (IL-2, IFN- γ , TNF- α) e tipo 2 (Th2) (IL-4) foi significativamente menor em pacientes com câncer de mama, mesmo em estádios iniciais da doença. Estes resultados indicam uma disfunção geral do sistema imune devido a um desequilíbrio na resposta Th1 e Th2 e postula-se que pacientes com câncer de mama apresentam redução das respostas das citocinas.

Ainda nesse estudo, foi observado que pacientes portadores de tumores grandes apresentavam maior supressão da resposta tipo 1 em relação a resposta tipo 2 e ausência de correlação entre a resposta imunológica com idade, estadiamento clínico e *status* linfonodal. Estes resultados sugerem que alterações nas células T não estão relacionadas ao estado geral do paciente, mas à presença da neoplasia e também a carga tumoral. Foi identificada também correlação inversa entre a resposta das células T, micrometástases e receptor hormonal. Pacientes com câncer de mama que apresentam aumento na resposta do tipo 1, próxima a de indivíduos normais, tendem a apresentar menos micrometástases, sugerindo que uma disfunção imune nessa resposta pode permitir a disseminação das células neoplásicas. Da mesma forma, pacientes com tumores positivos para receptores hormonais, principalmente, estrógeno e

progesterona, apresentam redução da resposta tipo 1, quando comparados com pacientes negativos para receptores hormonais (Campbell *et al.*, 1996).

Recentemente, Kim e colaboradores (2010) avaliaram em três grupos distintos de tumores da glândula mamária de cadelas (tumores benignos, carcinomas sem metástase e carcinomas com metástase) a presença e fenótipo dos linfócitos infiltrantes no tumor (TILs), a expressão das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α e a expressão do gene BRCA1. Os resultados observados demonstraram que o linfócito T representa o tipo celular predominante nos carcinomas mamários de alto grau, sugerindo que estas células possuem um papel na progressão e potencial metastático do tumor. As citocinas IL-1 e IL-6 apresentaram maior expressão nos tumores malignos com metástase, enquanto a expressão de TNF- α , interessante mente foi maior no grupo dos carcinomas sem metástase, não havendo diferença entre os tumores benignos e metastáticos. Ainda foi observada a associação entre a expressão dos linfócitos, citocinas e mutações no gene BRCA1, sugerindo que estes fatores possuem importante papel na progressão tumoral.

Outro fator que também possui destaque na imunologia tumoral é a proporção de células T reguladoras presentes no sítio tumoral. Percebe-se que, nos últimos anos, tem crescido o número de estudos relacionando ao papel dos linfócitos T reguladores a evolução do tumor. Liyanage e colaboradores (2010) em um estudo com mulheres portadoras de câncer de mama invasivo e câncer de pâncreas concluíram que o aumento dos linfócitos Treg no tumor, nos linfonodos regionais e no sangue periférico tem relação direta com a supressão da resposta imune anti-tumoral. O mecanismo de ação destas células envolve a secreção de citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF- β) que por sua vez, impedem a proliferação e a ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Esses resultados sugerem um importante papel das células Treg no processo de imunotolerância.

Os linfócitos infiltrantes no tumor (TILs) e os linfócitos do sangue periférico (PBLs) de mulheres com câncer em estágio avançado apresentam uma relação com a resposta imune deficiente (Miescher *et al.*, 1986; Catchpole *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2010). Desta forma, postula-se que a identificação das alterações fenotípicas de linfócitos pode ser utilizada para avaliar o perfil imunológico dos pacientes com câncer, possibilitando também intervenções na resposta imune antes e após o tratamento (Lin *et al.*, 2010).

3. HIPÓTESES

- A resposta inflamatória associada aos carcinomas mamários em cadelas promove o desenvolvimento tumoral independente da distribuição, intensidade e/ou constituição do infiltrado celular;
- Os linfócitos T CD4⁺ representam a população celular predominante nos carcinomas mamários da cadela, independente do subtipo histológico e, contribuem na progressão tumoral.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar a resposta inflamatória associada aos carcinomas mamários da cadela correlacionando os resultados com fatores prognósticos e com a taxa de sobrevivência dos animais.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os focos inflamatórios associados aos carcinomas mamários de cadelas;
- Realizar a imunofenotipagem dos leucócitos no sangue e massa tumoral identificando a população celular predominante;
- Caracterizar o padrão imunofenotípico dos leucócitos no sangue periférico e infiltrados na massa tumoral de cadelas com carcinoma mamário;
- Associar os dados encontrados com os fatores sabidamente prognósticos no câncer de mama da cadela, visando analisar possíveis fatores determinantes da resposta imune no desenvolvimento neoplásico, particularmente os associados às condições de susceptibilidade;
- Identificar a sobrevivência das cadelas a partir de acompanhamentos trimestrais até 12 meses após o procedimento cirúrgico;

- Identificar possíveis marcadores laboratoriais, aplicável como fatores prognósticos e preditivos da sobrevida para o acompanhamento clínico dos tumores mamários em cadelas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as bases físicas e a infra-estrutura do Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto/EMEV-UFBA e do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais.

5.1 Seleção de animais e Avaliação clínica

Foram utilizadas 51 cadelas de diferentes raças com idade variando de oito a dezoito anos com diagnóstico de carcinoma mamário, atendidas no Hospital Veterinário da UFBA (Bahia-Brasil) no período de outubro de 2008 a fevereiro de 2009. Todos os animais foram acompanhados, trimestralmente, até abril de 2010. Inicialmente, todos os animais com lesão mamária foram submetidos ao exame clínico. Esse exame consistiu na avaliação da condição clínica geral do animal, coleta de informações sobre o histórico clínico e ciclo reprodutivo (cio regular, número de partos, castração, utilização de tratamento hormonal, abortos, período de desenvolvimento das lesões, histórico de pseudociese e lesões prévias). Essas informações foram armazenadas em uma ficha oncológica específica segundo o protocolo modificado de Ferreira *et al.* (2003) (Anexo 1).

Foi realizado o estadiamento clínico com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), de acordo com o sistema TNM (modificado de Owen, 1980) (Anexo 2). Os tumores foram mensurados em pelo menos duas dimensões. Quando o animal apresentou mais de um nódulo, cada um deles foi medido separadamente, sendo considerada para a realização do estadiamento clínico a maior medida do tumor invasivo conforme critérios adotados pelo sistema TNM. A avaliação macroscópica dos linfonodos inguinais e axilares foi realizada pela palpação dos mesmos e a presença ou não de envolvimento neoplásico determinada pelo exame histopatológico após a exérese cirúrgica da mama envolvida.

Ao final do exame ambulatorial, foi coletado sangue periférico para hemograma e bioquímica sérica (Uréia, creatinina, FA e ALT), além disso, os animais foram encaminhados para realização de raio-x simples de tórax em três incidências: látero-lateral direita (LLD), látero-

lateral esquerda (LLE) e ventro-dorsal (VD) para pesquisa de metástase pulmonar e ultrassonografia de abdômen total. Após a determinação do risco cirúrgico, os animais aptos foram direcionados para a cirurgia. O tipo de cirurgia (mastectomia simples, em bloco ou radical) foi determinado pelo tamanho e localização do tumor, e drenagem linfática, considerando-se as margens de segurança.

5.2 Acompanhamento e Sobrevida

Os exames radiológicos, laboratoriais (hemograma e bioquímico – uréia, creatinina, ALT e FA) e clínicos foram repetidos trimestralmente até doze meses após a cirurgia, período de acompanhamento, no qual foram coletados dados sobre a sobrevida livre da doença e a sobrevida global. O tempo de sobrevida livre da doença foi definido (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a recorrência local ou metástase à distância, enquanto a sobrevida global foi definida (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença.

Os animais que vieram a óbito foram necropsiados no Setor de Anatomia Patológica/HOSPMEV-UFBA para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases. Nenhum dos animais estudados fez uso prévio (mínimo de trinta dias) de fármacos antineoplásicos ou antiinflamatórios, sendo esse aspecto um critério de exclusão dos animais na pesquisa. Todos os proprietários foram previamente informados sobre a realização do projeto de pesquisa que se desenvolveu dentro das normas exigidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo nº 191/06).

5.3 Biópsia Excisional e Histopatológico

Imediatamente após a cirurgia, foram coletados fragmentos da(s) mama(s) afetada(s), incluindo pele e tecido subcutâneo além dos linfonodos regionais. Na presença de tumores mamários múltiplos em um mesmo animal, no momento da exérese cirúrgica, a coleta dos fragmentos foi realizada separadamente e os frascos identificados com a glândula afetada.

Para o estudo, foi considerado o tumor de maior diâmetro presente na cadeia mamária da cadela, sendo então classificado de acordo com o tamanho em dois grupos: i) tumores medindo entre 3-5 cm e ii) os tumores com mais de 5 centímetros. Após esta classificação, dependendo do tamanho do tumor, três ou cinco fragmentos representativos da massa tumoral, respectivamente, medindo cada 1,5x1,5cm, foram selecionados aleatoriamente sendo, excluídas as áreas de necrose. Os fragmentos foram submetidos à avaliação histológica (diagnóstico e graduação), análise morfológica/morfométrica e imunofenotípica (do infiltrado tumoral). Os fragmentos coletados, excetuando-se os destinados a imunofenotipagem por citometria de fluxo foram fixados em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. As secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (Luna, 1968).

5.4 Caracterização da Neoplasia

5.4.1 Classificação Histológica

Todos os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica HOSPMEV/UFBA e para todos os casos foram confeccionadas duplicatas das lâminas, visando à análise por dois patologistas veterinários (LABAP/UFBA e LPC/UFMG). A identificação do tipo histológico seguiu a padronização da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Misdorp *et al.*, 1999) complementada pela proposta de Cassali *et al.*(2002) para os carcinomas micropapilares.

Na coexistência de proporções variadas de dois ou mais tipos histológicos em um mesmo tumor, a classificação histológica foi realizada segundo critérios adaptados da medicina para os tumores considerados variantes especiais. Na avaliação de carcinomas humanos, o tipo histológico especial deve representar entre 70% a 90% da área tumoral associado a áreas de carcinoma ductal invasor, ou tumores com expressão fenotípica incompleta (Elston & Ellis, 1998; Fitzgibbons *et al.*, 2000; Gouvêa, 2003). Neste estudo, considerou-se o tipo histológico predominante àquele que ocupou de 70% a 90% da área tumoral. A análise microscópica da pele foi realizada para o estudo de possíveis infiltrações neoplásicas e avaliação da resposta inflamatória adjacente.

5.4.2 Graduação Histológica

Foi utilizado o grau histológico de Nottingham (Bloom, Richardson modificado por Elston-Ellis, 1993), que inclui: percentual de diferenciação tubular; avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (Elston e Ellis 1993; Fitzgibbons *et al.*, 2000).

- Formação Tubular

Os fragmentos foram examinados considerando toda a área carcinomatosa e a proporção de formações tubulares foi avaliada semi quantitativamente. Estruturas tubulares foram definidas como aquelas que formam ductos exibindo lúme claro e visível. Quando mais de 75% da área tumoral foi composta de túbulos, o escore de 1 ponto foi dado. Dois pontos foram apropriados para tumores que exibiram entre 10% e 75% de formações tubulares. Tumores nos quais os túbulos ocuparam 10% ou menos da área, 3 pontos foram atribuídos.

- Pleomorfismo Nuclear

Visando introduzir maior objetividade nesta avaliação, utilizou-se como referência o tamanho e a forma das células epiteliais da mama normal adjacente ao tumor (Elston & Ellis, 1998). Desta forma, foi realizado julgamento quantitativo e qualitativo. Quando os núcleos eram pequenos e regulares em comparação com as células normais e a cromatina nuclear uniforme, o escore de 1 ponto foi atribuído. O escore de 2 pontos foi dado quando se verificou aumentos moderados no tamanho e variabilidade nucleares. Quando as células exibiram acentuado pleomorfismo, com grande variação no tamanho e forma dos núcleos, presença de núcleos bizarros, vesiculosos exibindo múltiplos nucléolos, o tumor recebeu o escore de 3 pontos.

- Contagem Mitótica

A contagem mitótica foi realizada por dois patologistas veterinários. Foi utilizado o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x. Este equipamento fornece uma área de 0,237 mm² visualizada em campo de maior aumento (CGA).

Para esta avaliação empregaram-se critérios morfológicos na identificação dos estágios de mitoses. Foram incluídas na contagem apenas as células claramente definidas em fases de prófase, anáfase, metáfase e telófase. Quando a membrana celular estava ausente e a condensação dos cromossomos estava presente considerou-se a célula em prófase. A ausência

de condensação cromossômica indicou o início de metáfase. As células que apresentaram cromossomos em um plano foram consideradas em metáfase e anáfase, e em pólos separados, em telófase (Van Diest *et al.*, 1992). Núcleos picnóticos ou hipercromáticos não foram contados uma vez que estas células poderiam estar relacionadas com processos de necrose ou apoptose.

As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA, selecionados preferencialmente na periferia do tumor onde se observa maior atividade de proliferação celular (Elston e Ellis, 1991; Elston e Ellis, 1998). Desta forma, um escore de pontos de 1 a 3 foi dado de acordo com o número de mitoses encontradas em 10 CGA. De acordo com a área de campo de 0,237 mm² obteve-se os seguintes escores: de 0 – 8 mitoses : 1 ponto; 9 – 16 mitoses : 2 pontos e acima de 17 mitoses : 3 pontos.

- *Alocação do Grau Histológico*

Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que varia de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:

3 – 5 pontos: grau I – baixo grau

6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário

8 – 9 pontos: grau III – alto grau

5.5 Identificação Fenotípica das diferentes populações leucocitárias nos processos inflamatórios associados aos tumores mamários caninos

5.5.1 Análise Morfológica e Morfométrica do Infiltrado Inflamatório Tumoral

A análise morfológica da reação inflamatória associada ao tumor, quanto a sua distribuição e intensidade, foi realizada nos oito campos mais representativos (“hotspots”), com auxílio de um microscópio Olympus BX-40 (ocular 10X e objetiva de 40X), nas secções histológicas de 4µm coradas pelo HE. O número de campos foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou (Sampaio,

2002). A distribuição do infiltrado inflamatório foi classificado nas áreas periféricas e intra-tumorais em: i) focal: presença de 1-3 focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de três focos inflamatórios e iii) difusa: presença de células inflamatórias uniformemente distribuídas na secção de tumor. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa) com base na análise morfométrica do infiltrado inflamatório total.

Para a análise morfométrica após a identificação e marcação dos oito campos, foi realizada a captura de imagens em câmera digital Spot Insign Color adaptado a um Microscópio Olympus BX-40, utilizando-se o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5 e o software Corel DRAW[®] versão 7.468 para análise das imagens. Linfócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos foram identificados com base nas suas características morfológicas e quantificados nas imagens capturadas de secções coradas pela HE. Para a identificação e quantificação dos eosinófilos foi utilizada a coloração especial denominada Chromotrope 2R. O número total de células foi obtido pela soma dos oito campos analisados, sendo a média utilizada para determinar os intervalos de intensidade. O infiltrado inflamatório foi classificado em: i) discreto; ii) moderado: e iii) intenso (Tabela 2).

Tabela 2. Intervalo de intensidade dos tipos celulares nos carcinomas mamários

Tipo Celular	Intensidade		
	Discreta	Moderada	Intensa
Linfócito	$x < 300$	$300 \leq x < 600$	$x \geq 600$
Macrófago	$x < 200$	$200 \leq x < 400$	$x \geq 400$
Plasmócito	$x < 200$	$200 \leq x < 400$	$x \geq 400$
Neutrófilo	$x < 200$	$200 \leq x < 400$	$x \geq 400$
Eosinófilo	$x < 50$	$50 \leq x < 100$	$x \geq 100$
Total	$x < 500$	$500 \leq x < 1000$	$x \geq 1000$

5.5.2 Imunofenotipagem dos Leucócitos Infiltrantes no Tumor

O protocolo estabelecido consistiu em colher após a exérese cirúrgica, a depender do tamanho do tumor, três ou cinco fragmentos representativos das áreas intra e peri-tumoral, medindo cada 1,5x1,5cm, e acondicioná-los em uma placa de Petri contendo RPMI 1640 gelado; em seguida procedeu-se a maceração dos fragmentos com auxílio de um macerador mecânico (Tissue grinder). O sobrenadante obtido com a maceração foi transferido com o auxílio de uma pipeta de 1000µl para um tubo Falcon contendo 5ml de RPMI. Procedeu-se a filtração com o auxílio de uma seringa e de um suporte filtrante. Após este procedimento, a suspensão celular permaneceu em repouso por 15 minutos e quando necessário o volume foi ajustado para 5 ml adicionando-se RPMI 1640 e em seguida foi realizada a centrifugação a 400 x g por sete minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado vertendo-se o tubo e as células (pellet) foram então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade e adicionados 4mL de RPMI 1640. Para contagem na câmara de Neubauer foram pipetados 10µl da suspensão acondicionados em eppendorf contendo 190µl de azul de Turck. A suspensão celular foi ajustada para concentração de 1×10^7 células/ml (Protocolo modificado de Teixeira-Carvalho, 2002).

Após o ajuste, em sete tubos cônicos de poliestireno de 12x75 mm (FALCON® – BECTON DICKINSON) contendo cada 40µL dos anticorpos diluídos (Tabela 1- Anexo 3), foram adicionados 40µL (4×10^5 células) da suspensão celular. Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 1 (Anexo 3), e os mesmos foram diluídos em PBS-W em diluições e combinações previamente estabelecidas na padronização do protocolo proposto por Araújo et al. (2008). As amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 1mL de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON), sob agitação no vórtex. As suspensões celulares permaneceram em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz; após esse tempo as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por sete minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos e as células foram então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade. Foram adicionados 2mL de PBS-W e as suspensões celulares foram submetidas novamente a uma centrifugação a 400 x g, por sete minutos a temperatura ambiente, sendo novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspenso e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma

vez. As células foram, então, fixadas com 100µL de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo onde foram avaliados 10 mil eventos. Os controles negativos foram anticorpos obtidos da empresa correspondente apresentando mesmo isotipo e produzidos na mesma espécie.

5.5.3 Obtenção do Sangue Periférico

Para avaliação da resposta imune celular no contexto *ex vivo*, foram realizadas coletas de 4mL de sangue de todos os animais antes do procedimento cirúrgico. O sangue foi coletado, em seringas descartáveis estéreis de 5mL, através de venopunção da jugular, e em seguida transferido para tubos estéreis contendo EDTA mantido a temperatura ambiente. Os parâmetros hematológicos e imunofenotípicos foram avaliados por um analisador automático de células do sangue (ADVIA ® 60, a Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, EUA) e um citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), respectivamente.

5.5.4 Ensaio de imunofenotipagem celular no contexto *ex vivo*.

Os anticorpos monoclonais utilizados nesta parte do trabalho estão descritos na Tabela 1 (Anexo 3), e os mesmos foram diluídos em PBS-W [solução salina tamponada com fosfato-PBS = 0,15M, 8g/l de NaCl, 2g/l de KCl, 2g/l de KH₂PO₄ e 1,15g/l de Na₂HPO₄, pH 7,2 com 0,5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,1% de azida sódica] em diluições e combinações previamente estabelecidas na padronização do protocolo proposto por Araújo *et al.* (2008).

Em sete tubos cônicos de poliestireno de 12x75 mm (FALCON® – BECTON DICKINSON) contendo cada 40µL dos anticorpos diluídos (Tabela 1- Anexo 3), foram adicionados 40µL de sangue total coletado como descrito no item “obtenção do sangue periférico”. As amostras de sangue periférico foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3mL de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON), sob agitação no vórtex. As suspensões celulares permaneceram em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz; após esse período as mesmas foram centrifugadas a 400 x g por sete minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos e as células foram então, homogeneizadas no vórtex a baixa

velocidade. Foram adicionados 3mL de PBS-W e as suspensões celulares foram submetidas novamente a centrifugação a 400 x g, por sete minutos a temperatura ambiente, sendo novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspenso e homogeneizado cuidadosamente; essa última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram fixadas com 100µL de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2g/l de cacodilato de sódio e 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo onde foram avaliados 10 mil eventos. Os controles negativos foram anticorpos obtidos da empresa correspondente apresentando mesmo isotipo e produzidos na mesma espécie.

5.5.5 Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo

Para a realização dos ensaios de imunofenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico de cadelas foram utilizados anticorpos monoclonais que permitiram a marcação das seguintes populações celulares; anti CD14 para marcação dos monócitos, anti Células B para linfócitos B, anti CD3 e CD5 para marcação de linfócitos T e anti CD4 e CD8 para as subpopulações de linfócitos T. Foram também utilizados anticorpos anti-moléculas de MHC I e MHC II por serem conhecidas como marcadores de ativação celular. No contexto da ativação celular, foi utilizado também o anticorpo monoclonal anti-CD18 por se tratar de uma molécula de adesão importante durante o processo de migração pós-ativação celular. Os anticorpos eram marcados com fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína - emitiam fluorescência tipo 1 -FL1), R-PE (Ficoeritrina – emitiam fluorescência tipo 2 - FL2) ou com PE-Cy-5 (ficoeritrina conjugada com cianina - emitiam fluorescência tipo 3 - FL3). Assim, foram utilizadas marcações duplas que permitiram a análise simultânea de mais de um parâmetro por tubo.

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem, as amostras foram analisadas no citômetro FACScalibur (BECTON DICKINSON, San Jose, CA, EUA), acoplado a um sistema de computador com programa específico (CELL QUEST®). A caracterização fenotípica, por citometria de fluxo, inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forward scatter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC), e intensidade relativa de fluorescência.

A obtenção dos dados por citometria teve início com a identificação da população celular de interesse (R1), após ajustes de ganho de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e/ou fluorescências (FL1, FL2 e FL3). Com a seleção da região de interesse (R1), foi feita a análise dos aspectos fenotípicos considerando duas abordagens distintas: a primeira, através do percentual de células positivas expressas em gráficos de dispersão pontual de fluorescência, equivalente à população positiva para cada marcador avaliado; e a segunda, avaliando a intensidade média de fluorescência (IMF) equivalente à densidade de expressão de um determinado marcador fenotípico, em gráficos do tipo histograma em escala logarítmica.

A primeira abordagem foi empregada para quantificar fenótipos celulares que apresentam distribuição bimodal, ou seja, caracterizadas por apresentarem populações positivas e negativas para o referido marcador fenotípico. Na segunda abordagem foi utilizada uma análise semi-quantitativa da expressão de marcadores fenotípicos que possuem distribuição unimodal, ou seja, toda a população celular de interesse expressa constitutivamente o referido marcador fenotípico. Nessas situações, alterações na densidade de expressão podem ocorrer, o que irá promover o deslocamento da população celular ao longo do eixo da intensidade de fluorescência. Em todos os experimentos foram analisados para cada amostra os controles das reações, que são importantes para avaliação da qualidade do perfil celular e detecções de eventual ocorrência de fluorescências inespecíficas.

5.5.6 Avaliação do desempenho dos parâmetros fenotípicos celulares.

O desempenho dos parâmetros fenotípicos celulares foi avaliado segundo diferentes índices expressos em percentual, incluindo: co-positividade = $[\text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})] \times 100$; co-negatividade = $[\text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})] \times 100$; valor preditivo positivo –VPP = $[\text{verdadeiros positivos} / \text{total de positivos}] \times 100$; valor preditivo negativo –VPN = $[\text{verdadeiros negativos} / \text{total de negativos}] \times 100$; positive likelihood ratio (LR+) = $\text{co-positivity} / (1 - \text{co-negativity})$; negative likelihood ratio (LR-) = $(1 - \text{co-positivity}) / \text{co-negativity}$

A *receiver operating characteristic curve* (curva ROC) foi construída aplicando-se na ordenada os valores de co-positividade e na abscissa o complemento da co-negatividade. Utilizou-se esta curva para a seleção do ponto de corte, como o valor que discrimina os resultados em positivos ou negativos. A análise da curva ROC permitiu ainda o cálculo da acurácia global dos parâmetros, avaliada através da área sob a curva ROC-ASC20. Para

construir as curvas ROC para os parâmetros avaliados, utilizou-se o programa estatístico MedCalc Statistical. Os intervalos de confiança de 95% foram calculados, utilizando o programa *Confidence Interval Analysis* (CIA) for Windows. O desempenho dos parâmetros fenotípicos celulares foi ainda avaliado através do índice expresso em chances denominado razão de verossimilhança (RV), calculados através das fórmulas: RV para o resultado positivo = [verdadeiro positivo/(verdadeiro positivo + falso-negativo)]/[falso positivo/(falso positivo + verdadeiro negativo)] e RV para o resultado negativo = [falso negativo/(verdadeiro positivo + falso-negativo)]/[verdadeiro negativo/(falso positivo + verdadeiro negativo)].

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism 3.0.3* (San Diego, CA) e MedCalc Statistical descrita nos artigos científicos.

7. PROTOCOLO - Comitê de Ética em Experimentação Animal

Aprovado pelo CETEA (protocolo 191/06). (Anexo 4)

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e a discussão serão apresentados de forma alternativa, como artigos científicos. Cada artigo está estruturado com base nas normas do periódico a que foi submetido.

ARTIGO 1

Estrela-Lima et al. *BMC Cancer* 2010, **10**:256
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/256>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates

Alessandra Estrela-Lima^{1,5}, Márcio SS Araújo², João M Costa-Neto¹, Andréa Teixeira-Carvalho², Stella M Barrouin-Melo¹, Sergio V Cardoso³, Olindo A Martins-Filho², Rogéria Serakides⁴ and Geovanni D Cassali^{*5}

Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates

Alessandra Estrela-Lima^{1;5}; Márcio Sobreira Silva Araújo²; João Moreira da Costa-Neto¹; Andréa Teixeira-Carvalho²; Stella Maria Barrouin-Melo¹; Sergio Vitorino Cardoso³; Olindo Assis Martins-Filho²; Rogéria Serakides⁴; Geovanni Dantas Cassali*⁵

¹ Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

² Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³ Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁴ Departamento de Clínicas e Cirurgia, Escola de Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Laboratório de Patologia Comparada (LPC), Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas– Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Alessandra Estrela-Lima: aestrela@ufba.br

Márcio Sobreira Silva Araújo: sobreira@cpqrr.fiocruz.br

João Moreira da Costa-Neto: jmcn@ufba.br

Andréa Teixeira-Carvalho: andreat@cpqrr.fiocruz.br

Stella Maria Barrouin-Melo: barrouin@ufba.br

Sergio Vitorino Cardoso: cardosov@gmail.com

Olindo Assis Martins-Filho: oamfilho@cpqrr.fiocruz.br

Rogéria Serakides: serakide@netuno.lcc.ufmg.br

Geovanni Dantas Cassali: cassalig@icb.ufmg.br

Corresponding author:

Geovanni Dantas Cassali, e-mail address: cassalig@icb.ufmg.br

Tel.: +5531 34992891; fax: +5531 3499287.

Abstract

Background: The immune system plays an important role in the multifactorial biologic system during the development of neoplasias. However, the involvement of the inflammatory response in the promotion/control of malignant cells is still controversial, and the cell subsets and the mechanisms involved are poorly investigated. The goal of this study was to characterize the clinical-pathological status and the immunophenotyping profile of tumor infiltrating lymphocytes and their association with the animal survival rates in canine mammary carcinomas.

Methods: Fifty-one animals with mammary carcinomas, classified as carcinomas in mixed tumors-MC-BMT = 31 and carcinomas-MC = 20 were submitted to systematic clinical-pathological analysis (tumor size; presence of lymph node and pulmonary metastasis; clinical stage; histological grade; inflammatory distribution and intensity as well as the lymphocytic infiltrate intensity) and survival rates. Twenty-four animals (MC-BMT = 16 and MC = 8) were elected to the immunophenotypic study performed by flow cytometry.

Results: Data analysis demonstrated that clinical stage II-IV and histological grade was I more frequent in MC-BMT as compared to MC. Univariate analysis demonstrated that the intensity of inflammation (moderate/intense) and the proportion of CD4+ ($\geq 66.7\%$) or CD8+ T-cells ($<33.3\%$) were not associated with worse survival rate. Multivariate analysis demonstrated that only lymphocytic infiltrate intensity ≥ 600 ($P = 0.02$) remained as independent prognostic factor. Despite the clinical manifestation, the lymphocytes represented the predominant cell type in the tumor infiltrate. The percentage of T-cells was higher in animals with MC-BMT without metastasis, while the percentage of T-cells was greater in animals with metastasized MC-BMT ($P < 0.05$). The relative percentage of CD4+ T-cells was significantly greater in metastasized tumors (both MC-BMT and MC), ($P < 0.05$) while the proportion of CD8+ T-cells was higher in MC-BMT without metastasis. Consequently, the CD4+/CD8+ ratio was significantly increased in both groups with metastasis. Regardless of the tumor type, the animals with high proportions of CD4+ and low CD8+ T-cells had decreased survival rates.

Conclusion: The intensity of lymphocytic infiltrate and probably the relative abundance of the CD4+ and CD8+ T-cells may represent important survival prognostic biomarkers for canine mammary carcinomas.

Background

Spontaneous mammary tumors of female dogs have various epidemiological, clinical, biological and genetic characteristics that are similar to those in women [1]. Several researchers have proposed the use of these tumors as models for comparative studies with humans [2-6].

The development of malignant tumors is controlled by a multifactorial biologic system that depends on genetic abnormalities as well as the interplay between tumor cells, stromal cells, and host inflammatory cells [7]. The inflammatory process associated with neoplastic growth involves a complex host response [8-10]. This response includes the innate immune response, and the highly specific but more slowly developing adaptive or acquired immune response, mediators and the interactions between chemokines, cytokines and receptors [11-13].

In certain situations, the cells responsible for modulation of the inflammatory response release chemokines and cytokines that stimulate cellular proliferation and angiogenesis, as well as inhibiting apoptosis, thus altering the immune response to aggression [8,14,15]. There is evidence that major inflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6, IL-23 and TNF- α) promote tumor development by acting directly or indirectly on neoplastic cells [10,15,16]. These factors together can accelerate mutagenesis and promote the survival of atypical clones with a greater capacity to invade tissues and organs [12].

Histological and immunohistochemical studies have demonstrated that mammary carcinomas are effectively infiltrated by different types of leukocytes, predominantly macrophages and lymphocytes consisting mainly of T-cells [17-19]. Initially, it was postulated that the presence of the inflammatory infiltrate in the tumor site was evidence of immune activity against the neoplastic growth. The functional role of tumor-infiltrating lymphocytes in dogs with mammary tumors is not yet fully established [20].

Thus, there is no consensus regarding the effectiveness of the anti-tumor response mediated by lymphocytes, or by the predominant lymphocyte subpopulations [7,18-22]. Nowak et al. (2007) [23] reported a correlation between the number of CD8+ cells and the metastatic potential of mammary adenocarcinomas in female dogs. However, the inflammatory response

associated with mammary carcinomas and its relationship with prognostic factors and the survival rate of female dogs has not been studied.

Aiming to understand the dynamic interaction and the association between host immune response and tumor development, this study was to evaluate the immunophenotypic features of infiltrating lymphocytes in canine mammary carcinomas and their relation to prognostic factors and survival.

Methods

Groups of animals

Fifty-one female dogs with mammary neoplasias measuring three centimeters or greater admitted at the Veterinarian Hospital of the *Universidade Federal da Bahia* (UFBA) were selected between October, 2008 to August, 2009. The animals were purebreds or mixed-breed with age ranging from of 8-18 years.

The tumor samples were classified based on the histopathological diagnosis according to Misdorp *et al.* (1999) [24] complemented by the proposal of Cassali *et al.* (2002) for classification of micropapillary carcinoma [25] and the animals divided into two groups: i) carcinomas in benign mixed tumors (MC-BMT, n = 31) and ii) carcinomas (MC, n = 20). Histological data reevaluated that MC group comprised distinct subtypes, including tubular (n = 3), papillary (n = 4), tubular-papillary (n = 3), solid (n = 4), micropapillary (n = 3), anaplastic (n = 2) and one special type referred as mucinous carcinoma, characterized by abundant mucin production. The study series of carcinomas was a selected series consisting as simple and mixed carcinomas exclusively.

Further categorization based on histological analysis of lymph node was further used to categorize the tumor samples into two subgroups referred as: i) (-) without lymph node metastasis [MC-BMT (-), n = 19; MC (-), n = 10] and ii) (+) with lymph node metastasis [MC-BMT (+), n = 12; MC (+), n = 10].

The clinical-pathological parameters, including tumor size, lymph nodes metastasis, pulmonary metastasis, clinical stage, histological grade, inflammation distribution and inflammation intensity, were used during comparative analysis between MC-BMT and MC.

Forty six animals were elected for the survival analysis [MC-BMT (-), n = 18; MC-BMT (+), n = 12; MC (-), n = 09; MC (+), n = 07]. Five out of 51 animals were excluded from the survival analysis because the owners have decided for euthanasia of the animals due to the advanced stage of the disease, the weakness of the animals or the impossibility of surgical excision, which was certified by the clinical, laboratory and radiological evaluations.

Twenty-four tumors samples were eligible for immunophenotypic analysis, yielding at least 2×10^6 leucocytes, including sixteen samples from the MC-BMT [MC-BMT (-), n = 08; MC-BMT (+), n = 08] and eight from the MC group [MC (-), n = 05; MC (+), n = 03].

After euthanasia, the diagnosis was confirmed by complete necropsy and histopathological analysis. None of the female dogs had prior use of anti-neoplastic drugs, anti-inflammatory drugs or antibiotics within the 30 days prior to surgical excision.

All procedures in this study were according to the guidelines set by the *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA). This study was approved by the Ethical Committee for the use of Experimental Animals of the *Universidade Federal de Minas Gerais*, Brazil (CETEA).

Clinical staging

The female dogs were initially submitted to a systematic clinical examination along with macroscopic evaluation of tumor and lymph nodes, histopathology of regional lymph nodes and thoracic radiological examinations, in order to accomplish a complete staging categorization.

Stage is determined from information on the size tumor (T), involvement of regional lymph node (N) and the presence or absence of distant metastases (M). Stages # II, III, IV and V were defined based on TNM system previously describe by Owen, 1980 [26].

The clinical anamnesis was carried out by detailed evaluation of physiological parameters, analysis of historical evolution and reproductive records along with biochemical and

hematological analysis. The macroscopic evaluation included determination of tumor features (size, presence of inflammatory reaction and/or ulceration) and location and analysis of regional lymph nodes by palpation.

The confirmation of neoplastic involvement was determined by histopathological analysis of inguinal and axillaries lymph nodes. Thoracic radiological examinations were performed in three planes (right lateral and left lateral and ventral-dorsal) to search for lung metastasis.

Upon suspect clinical diagnosis, forty-six female dogs underwent surgical excision by mastectomy (regional or radical depending on the tumor size, location and aspects of the lymphatic drainage). Immediately after surgery, the mammary chain was sent to the Department of Pathology, at *Universidade Federal da Bahia*, for macroscopic and microscopic characterization of the tumor features.

The forty six animals included in the survival rate analysis were submitted to quarterly follow-ups during twelve months, including systematic clinical evaluation, radiological examinations along with biochemical and hematological analysis. Survival rates were expressed in days between the surgical excisions of the end of follow-up.

Tumor samples

The tumors were first classified according to size into two groups: i) tumors measuring between 3-5 centimeters and ii) tumors measuring more than 5 centimeters. In cases with multiple nodules, the larger tumor size was considered during the classification procedures. Following classification, depending on the tumor size, three or five fragments, representative of intratumor and peripheral tumor areas were randomly selected and removed from each tumor. Necrotic areas were excluded. Tumor fragments, measuring 1.5×1.5 cm, were submitted to histological, morphological/morphometric and immunophenotypic analysis.

Histological classification and grade

Fragments of the affected mammary gland that included skin and subcutaneous tissues were fixed in phosphate buffered 10% neutral formalin and processed by the routine technique of paraffin embedding. Histological sections (4 μ m) underwent hematoxylin-eosin (HE) staining [27]. In all cases, duplicate slides were prepared and analyzed by two veterinarian pathologists.

The histological classification was performed according to the World Health Organization system (WHO) [24] complemented by the proposal of Cassali et al (2002) for classification of micropapillary carcinoma [25]. Tumors with foci of malignant-appearing cells or distinct nodules of such cell occurring in complex adenomas or benign mixed tumors were diagnosed as carcinomas in benign mixed tumors (MC-BMT). Tumors composed of one type of malign cell either resembling luminal epithelial or myoepithelial cells were diagnosed as carcinomas (MC) [24]. Figure 1 shows representative images of MC-BMT (Figure 1A) and MC in solid growth pattern (Figure 1B).

Histological grade was defined according to Elston and Ellis (1991) [28] using 4 μ m HE stained tissue sections. For nuclear pleomorphism, the score #1 was used when the nuclei were small, with little increase in size in comparison with normal breast epithelial cells, and had regular outlines and a uniformity of nuclear chromatin. The score of #2 was assigned when the cells were larger than normal, had open vesicular nuclei with visible nucleoli, and showed moderate variability in size and shape. The score #3 corresponded to marked variation in size and shape, especially when very large and bizarre nuclei were vesicular with prominent and often multiple nucleoli.

Strict criteria for identification of mitotic figures were employed according to Diest et al. (1992) [29]. Mitotic activity was assessed as the number of mitosis cells per 10 fields, performed by two independent analysts in a blinded fashion, using an Olympus BX-40 microscope fitted to a 10 \times eyepiece and a 40 \times objective. Using this equipment, one high power field visualizes an area of 0.239 mm² [30]. Tumor up to 7 mitotic figures was scored as 1 point, 8-16 mitotic figures as 2 points and more than 17 mitotic figures as 3 points. Final histological grade was obtained by adding up the scores #1, #2 and #3 and classified as follows: i) grade I: 3-5 points, well differentiated; ii) grade II: 6-7 points, moderately differentiated and grade III: 8-9 points, poorly differentiated.

Morphological/morphometric analysis of tumor inflammatory infiltrate

The analysis of morphological aspects was carried out in 4 μ m HE stained histological sections and the inflammatory reaction classified by the distribution and by the intensity. The distribution of inflammatory infiltrates were evaluated in peripheral and intra-tumor areas and classified as: i) focal: presence of 1-3 inflammatory foci; ii) multifocal: presence of more than 3 inflammatory foci and iii) diffuse: presence of inflammatory cells evenly distributed in the

tumor section. The intensity of the inflammatory reaction was categorized into three subgroups (discrete, moderate or intense) based on morphometric analysis of total inflammatory infiltrate.

The morphometric analysis was carried out in eight selected "Hot Spots" histological fields using an Olympus BX-40 microscope fitted to a 10× eyepiece and a 40× objective, representative of both peripheral and intratumor areas. Morphometric analysis was assessed as the number inflammatory cells per eight fields. Images were captured using an oil immersion 100× objective (a digital camera was adapted to an Olympus BX-40 microscope), and the capture software SPOT version 3.4.5. The inflammatory cells were characterized by image analysis (Corel Draw software version 7.468). Neutrophils, macrophages, lymphocytes and plasma cells were identified based on their morphological features and quantified in HE stained sections. The eosinophils were identified and quantified using additional analysis of Chromotrope 2R staining of serial histological sections [31].

The total number of cells was obtained by adding the eight fields analyzed. The inflammatory infiltrate was first classified as: i) discrete: presence of less than 500 inflammatory cells; iii) moderate: presence of 500-1000 inflammatory cells and iii) intense: presence of more than 1000 inflammatory cells. The cut-off edges were determined based on the mean number of cells. For data analysis, two intervals were used considering the intensity of the lymphocytic infiltrate: i) discrete + moderate ($x < 600$ lymphocytes) and ii) intense (≥ 600 lymphocytes), respectively.

Immunophenotyping of tumor lymphocytic infiltrate by flow cytometry

Tumor fragments from twenty four dogs females, representative of peri/intra-tumor areas were available for immunophenotypic analysis by flow cytometry as suggested by Teixeira-Carvalho *et al.*, 2002 [32], modified as follows: tissue fragments were immersed in cold RPMI 1640 (5 mL) in Petri dish and placed on ice for maceration. The tissue were processed in tissue grinder and then filtered on stainless steel gaze to obtain single cell suspension.

The cell suspension was washed twice in RPMI- 1640 and resuspended at a concentration of 1×10^7 cells/ mL. Aliquots of 40 μ L (4×10^5 cells) were incubated for 30 minutes at room temperature in the dark in 12×75 mm polystyrene tubes with 10 μ L of previously diluted monoclonal antibodies (mAbs), including: anti-canine CD4-FITC or RPE 1:320 (rat-IgG2a,

clone YKIX302.9), anti-canine CD8-FITC or RPE 1:40 (rat-IgG1, clone YCATE55.9) and anti-canine B cell-RPE 1:160 (Mouse IgG1, Clone: CA2.1D6), all of which were produced by Serotec (Oxford, UK). The combinations and dilutions of mAbs were used as proposed by Araujo et al. (2008) [33]. After incubation, 1 mL of lysing solution (FACS brand lysing solution, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) was added to each tube while vortexing and incubated for 10 minute at room temperature in the dark.

The negative controls used were mAbs of the same isotype, produced in the same species, and obtained from the same manufacturer. Stained cells were washed twice with 2 mL PBS (phosphate buffered saline 0.15 M, pH 7.2) and then fixed with 100 μ L of FACS FIX solution (10.0 g/l paraformaldehyde, 10.2 g/l sodium cacodylate and 6.65 g/l sodium chloride). A total of 10,000 events were run in a FACSCalibur flow cytometer, using the Cell Quest™ software (Becton Dickinson San Jose, CA, USA). Data analysis was performed by first gating the lymphocyte population based on their forward scatter (FSC) versus side scatter (SSC) properties. Following, the immunophenotypic features were analyzed on dual color FL1/FITC versus FL2/ R-PE dot plots. The results were expressed as percentage of positive cells (T-cells and B- cells) within gated lymphocytes and also as the relative percentage of CD4+, CD8+ T-cells and the CD4+/CD8+ T-cell ratio within gated T-cells. In the survival analysis two intervals were considered for the relative percentages of CD4+ and CD8+ T-cell subsets within gated T-cells: i) low (<66.7% of CD4+ T-cells and \geq 33.3% of CD8+ T-cells) and ii) high (\geq 66.7% of CD4+ T-cells and <33.3% of CD8+ T-cells).

Statistical methods

Fisher's exact test was performed to verify the significance of presumptive associations between categorical variables. Data were grouped as follows: histological diagnosis (MC-BMT or MC); tumor size (3-5 cm or >5 cm); lymph node metastasis (no or yes); pulmonary metastasis (no or yes); clinical stage (II, III, IV or V); histological grade (I, II or III); inflammatory distribution (focal, multifocal or diffuse) and inflammatory intensity (discrete, moderate or intense), lymphocytic infiltrate intensity (<600 or \geq 600 lymphocytes) as well as the relative percentage of CD4+ T-cells (\geq 66.7%) and CD8+ T-cells (>33.3%).

For quantitative variables, Kolmogorov-Smirnov test initially assessed the normality of distribution. Then, differences between groups were assessed by Student's *t* / Mann-Whitney's *U* tests (when two groups were compared), or ANOVA/Kruskal-Wallis test (more than two groups) whether parametric/non parametric samples were evaluated, respectively. In the same way, possible correlations were investigated by Pearson/Spearman tests.

Survival curves were generated by Kaplan-Meier estimation method and compared by Log-rank (Mantel-Cox) or Cox proportional hazards tests in univariate or multivariate analysis, respectively. Groups were determined as above.

In all instances, *p* value < 0.05 was considered to be statistically significant. Analyses were performed using the softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) or SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Clinical and pathologic features

Comparative analysis of clinical and pathologic findings between MC-BMT and MC are presented in Table 1. MC was significantly associated with more frequent pulmonary metastasis, advanced clinical stage and higher histological grade.

Morphologic and morphometric analysis

Inflammation was more frequently diffuse and intense in MC than MC-BMT, but this association lack statistical significance, as shown in Table 2.

Additional morphometry analysis revealed that lymphocytes were the predominant cell type, with significantly higher number in comparison to the other inflammatory cells ($p < 0.001$), except in the MC (-) subgroup, where the number of lymphocytes and neutrophils were similar (Figure 2). No significant differences in the number or percentage of lymphocytes were observed between MC-BMT and MC groups (Figure 2).

Further comparison between peripheral and intratumor areas did not demonstrated any significant differences in the morphological and morphometric features of the inflammatory infiltrates (data not shown).

Flow cytometric immunophenotyping of tumor infiltrating lymphocytes

In this study we have evaluated 24 tumors, 16 from the MC-BMT and 8 from the MC group. The frequency of T and B-lymphocytes as well as CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets and their ratio are shown in the Figure 3A. Despite no significant differences were observed between the MC-BMT and MC groups, significant differences were observed when comparing subgroups of animals categorized based on the presence or absence of metastasis (Figure 3B).

Data analysis demonstrate that MC-BMT(-) had significantly higher ($P < 0.05$) percentage of T-cells in comparison to MC-BMT(+). On the other hand, significant ($P < 0.05$) higher percentage of B-lymphocytes were observed in MC-BMT(+) in comparison to MC-BMT(-) (Figure 3B). There were no significant differences in the percentage of T and B-lymphocytes between the MC subgroups. The relative percentage of CD4⁺ T-cells within the total T cells was significantly higher ($P < 0.05$) in both MCBMT(+) and MC(+) (Figure 3B). Interestingly, the proportion of CD8⁺ T-cells within the total T-cells was significantly enhanced ($P < 0.05$) both MC-BMT(-) and MC(-) (Figure 3B). These finding led to significant higher ($P < 0.05$) CD4⁺/CD8⁺ T-cells ratio in both MC-BMT(+) and MC(+) (Figure 3B).

Survival curves comparison

The survival curves comparison stratified based on the histological diagnosis, demonstrated significant ($P = 0.0014$) lower values in the MC group as compared to MC-BMT group (Figure 4). Additional analysis revealed that MC-BMT (-) and MC (-) had significantly ($P = 0,009$ and $P = 0,033$, respectively) higher survival rates as compared to MC-BMT (+) and MC (+) (Figure 4). The minimum survival was 25 days post surgery and the maximum survival period was 307 days.

Additional analysis demonstrated that animals with discrete/moderated tumor lymphocytic infiltrate (<600 lymphocytes) showed significantly higher survival rates as compared to those with intense lymphocytic infiltrate (≥ 600 lymphocytes) ($P = 0.0035$) (Figure 5A). Similar findings were observed in the analysis between MC subgroups ($P = 0.022$), with no differences observed between MC-BMT subgroups ($P = 0.0871$) (Figure 5B).

Further analysis demonstrated that animals with tumor infiltrating lymphocytes composition with higher relative percentage of CD4+ T-cells and lower proportion of CD8+ T-cells had lower, but not significant ($P = 0.191$) survival rate (Figure 6A). Moreover, the correlation analysis revealed that there was a significant ($P = 0.0304$) negative association between the percentages of CD4+ T-cells and the animal survival in days. Moreover, a positive correlation was observed between the frequency of CD8+ T-cells within the tumor infiltrating lymphocytes and the animal survival in days (Figure 6B).

Univariate analysis

Histological diagnosis of MC, tumor size > 5 cm, presence of lymph node or pulmonary metastasis, histological grade II-III, multifocal inflammatory distribution, and lymphocytic infiltrate intensity ≥ 600) displayed a negative association with animal survival (Table 3).

Multivariate analysis

Only lymphocytic infiltrate intensity ≥ 600 (coefficient = 4.1252; SE = 1.8260; OR = 61.8804; confidence interval = 1.7268-2,271.4921; $P = 0.0239$) remained as independent prognostic factor of survival rates in the final model (Table 3).

Additional analysis demonstrated significant association between lymph node metastasis ($P = 0.04$) and clinical stage ($P = 0.003$) with distinct intervals of lymphocytic infiltrate intensity (Table 4).

Discussion

The functional role of tumor-infiltrating lymphocytes in canine mammary carcinomas is not yet fully established and therefore the analysis of association between host immune response and disease outcome may point out a possible association between immunophenotypic features of infiltrating lymphocytes and their relation to prognostic factors and survival.

In this study, the percentage of T-lymphocytes was significantly greater in the animals from the MC-BMT group without metastasis, suggesting an effective protective role in preventing

tumor development. In fast growing tumors, the presence of T-cells constitutes an interesting prognostic indicator when compared with non-immunogenic tumors, since their presence correlates positively with the absence of metastasis in lymph nodes, smaller tumor size, lower histological grade and longer disease free survival time [7].

Additionally, our findings demonstrated that animals from the MC-BMT group with lymph node metastasis presented higher percentage of tumor infiltrating B-lymphocytes. The role of tumor infiltrating B-cells is still controversial. Some studies have demonstrated that chronic activation of B-cells contributes to tumor development by inhibiting the activity of CD4+ T-cells by yet unknown mechanisms [13]. However, our data demonstrated that together with the enhanced levels of B-cells, high frequency of CD4+ T cells was observed in animals with worse prognosis in MC-BMT tumors. Moreover, other studies have pointed out that, the acute activation of B-cells may have a key role in early elimination of neoplastic cells, through the secretion of antigen-specific immunoglobulins, thus participating in the regression of tumors [7,11]. Together, these findings demonstrated that the search for B-cell-related biomarkers to canine mammary carcinoma still needs further investigation to provide a more conclusive hypothesis.

Our data demonstrated that the enhanced proportion of CD4+ T-cells besides the lower relative percentage of CD8+ T-cells leading to higher CD4+/CD8+ T-cell ratio observed in animals with metastasis may represent another relevant biomarker to be used in follow-up studies. The maintenance of the CD4+/CD8+ T-cell ratio has been pointed out as an important prognostic factor in the progression of human breast cancer [34]. Additional longitudinal studies still need to be conducted to certify this hypothesis.

In fact, the higher infiltration of CD4+ T-cells was observed in the groups with the worst prognosis [MCBMT(+) and MC(+)], and was associated with tumor progression, metastasis and poor survival. Machetti and colleagues (2006) reported similar results and believe that a greater percentage of CD4+ T-cells is correlated with the induction of angiogenesis, secretion of immuno-inhibitory cytokines and intratumor estrogen conversion [35].

On the other hand, regardless the tumor type, the majority of animals displaying increased percentage of CD8+ T-cells did not present metastasis. Therefore, our findings suggest that the number of CD8+ T-cells may represent a good complementary prognosis biomarkers, since there was a significantly higher percentage of this cell population in both groups MC-

BMT(-) and MC(-), suggesting that these cells have an inhibitory action, either direct or indirect, in tumor progression that results in increased animal survival. Similar results were observed by Leong and colleagues (2006) [36], assessing the phenotypes of lymphocytes in ductal carcinomas in women. However, Sheu et al. (2008) [34] observed a significant correlation between the increase of CD8+ T-cells and clinical staging in breast cancer. Likewise, Nowark and colleagues (2007) [23] also reported a positive correlation between the number of CD8+ T-lymphocytes located in the tumor stroma and metastasis to lymph nodes in female dogs suffering from mammary carcinoma.

Tumor infiltrating T-lymphocyte may be involved in distinct mechanism depending on the cell subset. It is believed that while CD8+ T-cells play an important protective role controlling the tumor development, the CD4+ T-cells may present a dual role, participating with dichotomic specific immune response to the tumor, controlling or inducing the tumor progression depending on the production of distinct cytokines patterns [8-11,37,38]. Some studies have associated that the predominance of CD4+ T-lymphocytes in the tumor site is capable of "controlling" the expansion of CD8+ T-lymphocytes, thus inhibiting an effective antitumor response [34]. This may explain why some animals survived, despite the high number of tumor infiltrating CD4+ T-cells. It is possible that these CD4+ T-cells may synthesize pro-inflammatory cytokines related to the protective anti-tumor immune response. It has been demonstrated that the presence of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinomas associated with the production of potentially anti-inflammatory cytokines, such as IL-4, IL-10, and TGF- β would be associated with an immunomodulatory microenvironment, triggering mechanism of tumor escape from the immune system [17].

It is possible that the activation of both pro-inflammatory CD4+ T-cells and cytotoxic CD8+ T-lymphocytes in adequate proportions leads to an efficient immune response that control the growth of tumor cells [39]. However, the role of pro-inflammatory CD4+ T-cells in the tumor control is still controversial.

The presence of inflammatory cells in human tumors has been linked by some researchers to an immune response inefficient in preventing tumor development [16,35,40]. There is evidence that some inflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6, IL-23 and TNF- α) promote tumor development by acting directly or indirectly on neoplastic cells [10,15,16]. It is possible that the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is in fact more relevant than the isolate analysis of a given cytokine.

In our study, several clinical-pathological parameters showed significant association with the survival rates, including the histological type (MC), size (>5 cm), the presence of lymph node and pulmonary metastasis, the histological grade (II-III), the inflammatory distribution (multifocal) and the lymphocytic infiltrate (≥ 600 lymphocytes). These findings re-emphasize previous reports that highlight the importance of monitoring these clinical-pathological features in order to understand the biological behavior of mammary cancer [41-48]. Although, these parameters provide valuable information regarding diagnosis, prognosis and therapy [46,47], the lymphocytic infiltrate intensity (>600) was the only prognostic factor with independent association with lower survival rates in our investigation.

The higher numbers of infiltrating lymphocytes, along with the presence of metastasis were observed in the groups of animals with lower survival rates. As the survival in days displayed a negative association with the % of CD4+ T-cells and positive correlation with the % of CD8+ T-cells, it is possible that the higher number of infiltrating lymphocytes may reflected in higher number of CD4+ T-cells and together these variables may be biomarkers related to worse prognosis. On the other hand, animals with lower of infiltrating lymphocytes, but those with preferentially infiltration of CD8+ T-cells may present better prognosis.

Conclusion

Our data demonstrated that from the immunophenotypic standing point, the analysis of tumor infiltrating CD4+ and CD8+ T-cells may represent important complementary prognosis biomarkers to be further investigated in canine mammary carcinomas. The higher percentage of infiltrating CD4+ T-cells was observed in animals with the worse prognosis, including those with lymph node metastasis and lower survival in days. Moreover, the percentage of infiltrating CD8+ T-cells was correlated with absence of metastasis and higher survival span in canine mammary carcinomas. The importance of B-cells as a prognostic biomarker still remain to be elucidated, may be approaching further analysis of B-cell subsets and their activation status.

Furthermore, additional studies are still needed to expand our understanding of the complex mechanisms involved in the function and interaction of infiltrating CD4+ T-lymphocytes, their cytokine biosynthesis, as they relate to increased malignancy and metastasis, and of the

role played by CD8+ T-cells in inhibiting tumor development, determining the tumor microenvironment that favor the control mechanisms in canine mammary carcinomas.

Abbreviations

MC-BMT: Mammary carcinoma in mixed tumors; MC: Mammary carcinoma;
(+): presence of metastasis; (-): absence of metastasis

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AEL: conceived the study, participated in the immunoassays, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. **MSSA:** carried out the immunoassays, performed the statistical analysis and participated in the design of the study. **JMCN:** carried out the immunoassays and participated in the design of the study. **SMBM:** Analyzed and interpreted clinical data. **ATC:** participated in the design of the study. **SVC:** performed the statistical analysis and interpreted and analyzed data. **OAMF:** participated in design of the study and interpreted and analyzed of data cytometry. **RS:** participated in the study design and revised the manuscript. **GDC:** participated in design and coordination of the study and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported in part by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais* (FAPEMIG) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES). ATC, OAMF, RS and GDC are grateful for CNPq research fellowship (PQ). The authors thank the program for technological development in tools for health - PDTIS - FIOCRUZ for use of its facilities.

References

1. Misdorp W: **Tumors of the mammary gland**. In *Tumors in Domestic Animals* 4th edition. Edited by: Meuten DJ. Iowa State: University of California; 2002:575-606.
2. Peleteiro MC: **Tumores mamários na cadela e na gata**. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 1994, 89(509):10-29.
3. Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC: **Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours**. *Cytopathology* 2007, 18(3):191-6.
4. Genelhu MC, Cardoso SV, Gobbi H, Cassali GD: **A comparative study between mixed-type tumors from human salivary and canine mammary glands**. *BMC Cancer* 2007, 7:218.
5. Bertagnolli AC, Cassali GD, Genelhu MCLS, Costa FA, Oliveira JFC, Goncalves PBD: **Immunohistochemical expression of p63 and Δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression**. *Veterinary Pathology* 2009, 46:407-415.
6. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, Monica N, Rinaldis E: **Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors**. *BMC Genomics* 2009, 135(10):1-20.
7. Denardo DG, Coussens LM: **Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression**. *Breast Cancer Research* 2007, 9(4):1-10.
8. Coussens LM, Werb Z: **Inflammatory cells and cancer: think different!** *Journal Experimental Medicine* 2001, 193(6):23-26.

9. De Visser KE, Eichten A, Coussen L: **Paradoxical roles of the immune during cancer development.** *Nature Reviews* 2006, 6:24-40.
10. Stewart THM, Heppner GH: **Immunological enhancement of breast cancer.** *Parasitology* 1997, 115:141-153.
11. Whiteside TL: **The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth.** *Oncogene* 2008, 27:5904-5912.
12. Thun MJ, Henley SJ, Gansler T: **Inflammation and cancer: an epidemiological perspective.** *Novartis Found Symposium* 2004, 256:6-21.
13. Whiteside TL: **The local tumor microenvironment.** In *General Principles of Tumor Immunotherapy: Basic and Clinical Applications of Tumor Immunology* Edited by: Kaufmann H, Wolchok JD. Springer; 2007:145-167.
14. Marx J: **Inflammation and cancer: The link grows stronger.** *Science* 2004, 306:966-968.
15. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: **Cancer-related inflammation.** *Nature* 2008, 454(7203):436-44.
16. Murri AM AI, Hilmy M, Bell J, Wilson C, McNicol AM, Lannigan A, Doughty JC, McMillan DC: **The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer.** *British Journal Cancer* 2008, 99:1013-19.
17. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, Syrjanen K: **Lymphocytes infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer.** *European Journal Cancer* 1992, 28:859-864.
18. Camp BJ, Dyhrman ST, Memoli VA, Mott LA, Barth RJ: **In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes.** *AnnalsSurgical Oncology* 1996, 3(2):176-184.

19. Ben-Baruch A: **Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions.** *Breast Cancer Research* 2003, 31(5):31-36.
20. Rutten VP, Misdorp W, Gauthier A, Estrada M, Mialot JP, Parodi AL, Rutteman GR, Weyer K: **Immunological aspects of mammary tumors in dogs and cats: a survey including own studies and pertinent literature.** *Veterinary Immunopathology* 1990, 26(3):211-25.
21. O'Sullivan C, Lewis CE: **Tumor associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma.** *Journal Pathology* 1994, 172:229-235.
22. Whiteside TL, Miescher S, Hurlimann J, Moretta L, von Flidner : **Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltration human breast carcinomas.** *Cancer Immunology Immunotherapy* 1986, 23:169-178.
23. Nowak M, Madej JP, Rossowska J, Madej JA: **Involvement of CD8+ cells in protective mechanisms in canine mammary adenocarcinomas (short communication).** *Bull Veterinary Institute Pulawy* 2007, 51:445-448.
24. Misdorp W, Else W, Hellm'en E, Lipscomb TP: **Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat.** In *Second Series. WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals Volume 2.* Washington, DC, AFIP; 1999:s59.
25. Cassali GD, Serakides R, Gartner F, Schmitt FC: **Invasive micropapillary carcinoma. A case report.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2002, 54(4):366-369.
26. Owen LN: **TNM Classification of tumors in Domestic Animals.** World Health Organization, Geneva; 1980:26-32.
27. Luna LG: **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.** New York: McGraw Hill; 1968.
28. Elston CW, Ellis IO: **Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with long-term followup.** *Histopathology* 1991, 19:403-410.

29. Van Diest JP, Baak JPA, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans EC, Van Galen CM, Kurver PH, Bellot SM, Fijnheer J, Van Gorp LH, Kwee WS: **Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: Results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project.** *Human Pathology* 1992, 23:603-607.
30. Dutra AP, Azevedo Junior GM, Schmitt FC, Cassali GD: **Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors.** *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia* 2008, 60(6):1403-1412.
31. Lendrum AC: **The staining of eosinophil polymorphs and enterochromaffin cells in histological sections.** *The Journal of Pathology and Bacteriology* 1944, 56(3):441.
32. Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Andrade ZA, Cunha-Mello JR, Wilson RA, Correa-Oliveira R: **The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human Schistosomiasis mansoni infection.** *Scandinavian Journal Immunology* 2002, 56:315-322.
33. Araujo MSS, Andrade RA, Vianna LR, Reis AB, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Mallo MN, Martins-Filho OA: **Despite Leisvaccine and Leismune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis.** *Vaccine* 2008, 26:2211-24.
34. Sheu BC, Kuo WH, Chen RJ, Huang KJ, Chow SN: **Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer.** *The Breast* 2008, 17:604-610.
35. Macchetti AH, Marana HRC, Silva JS, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S: **Tumor-infiltration CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement.** *Clinics* 2006, 61(3):203-208.
36. Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, Ithnin H, Abdullah M, Davis WC, Seow HF: **Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast.** *Immunology Letters* 2006, 102:229-236.

37. Forman J: **T cells, the MHC, and function.** *Immunology* 1984, 81:203-219.
38. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H: **The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response.** *Journal Experimental Medicine* 1998, 188(12):2357-2368.
39. Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T: **B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity.** *Nature Medicine* 1998, 4(5):627-630.
40. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC: **Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma.** *American Cancer Society* 1999, 86(8):1537-1543.
41. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ: **Prognostic factors in breast cancer.** College of American Pathologists Consensus Statement, 1999. *Archives Pathology & Laboratory Medicine* 2000, 124:966-978.
42. Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Waters J: **Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors.** *Journal Veterinary Internal Medicine* 2003, 17:102-106.
43. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD: **The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours.** *Veterinary and Comparative Oncology* 2009:1-6.
44. Withrow SJ, Mac Eween EG: **Tumors of the mammary gland.** In *Small Animal Clinical Oncology* 3rd edition. Edited by: Withrow SJ, Mac Eween EG. W. B. Saunders Company, Philadelphia; 2001:455-77.
45. Marti'n De Las Mulas J, Milla' NY, Dios R: **A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog.** *Veterinary Pathology* 2005, 42:200-212.
46. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, MuLler BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Torne C, Weichert W, Engels K, Solbach C,

Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G: **Tumor associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Journal of Clinical Oncology* 2010, 28(1):105-113.

47. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM: **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** *Modern Pathology* 1998, 11(2):155-168.

48. Hellmen E, Bergstrom R, Holmberg L, Spangberg I-B, Hansson K, Lindgren A: **Prognostic factors in canine mammary tumor: A multivariate study of 202 consecutive cases.** *Veterinary Pathology* 1993, 30:20-27.

List of Tables and Figures

Table 1. Pathological and clinical status of mammary carcinomas in female dogs

Parameters	All (n=51)	MC-BMT (n=31)	MC (n=20)
Lymph node metastasis	43.0% (22/51)	39.0% (12/31) b	50.0% (10/20)
Pulmonary metastasis	13.7% (07/51)	9.7% (3/31)	20.0% (04/20)
Histological grade			
Grade I	58.8% (30/51)	80.6% (25/31)	25.0% (05/20)
Grade II	29.4% (15/51)	19.0% (06/31)	45.0% (09/20)
Grade III	11.8% (06/51)	0.0% (0/31)	30.0% (06/20)
Size			
3-5cm	35.3% (18/51)	35.5% (11/31)	35.0% (07/20)
>5cm	64.7% (33/51)	64.5% (20/31)	65.0% (13/20)
Clinical Stage			
Stage II	29.4% (15/51)	29.0% (09/31)	30.0% (06/20)
Stage III	25.5% (13/51)	29.0% (09/31)	20.0% (04/20)
Stage IV	29.4% (15/51)	38.7% (12/31)	15.0% (03/20)
Stage V	15.7% (08/51)	3.2% (01/31)*	35.0% (07/20)

* Significant intragroup and intergroup difference at $P < 0.05$.

Table 2. Morphological and morphometric analysis of inflammatory infiltrate associated with mammary carcinomas in female dogs

Parameters	Total (n=51)	MC-BMT (n=31)	MC (n=20)
Distribution			
<i>Focal</i>	4.0% (02/51)	6.5% (02/31)	0.0% (0/20)*
<i>Multifocal</i>	62.7% (32/51)*	70.9% (22/31)*	50.0% (10/20)
<i>Diffuse</i>	33.3% (17/51)	22.6% (07/31)	50.0% (10/20)
Intensity			
<i>Discrete</i>	31.4% (16/51)	41.9% (13/31)	15.0% (03/20)*#
<i>Moderate</i>	37.3% (19/51)	32.3% (10/31)	45.0% (09/20)
<i>Intense</i>	31.4% (16/51)	25.8% (08/31)	40.0% (08/20)

*, # Significant intragroup and intergroup differences at $P < 0.05$, respectively.

Table 3. Univariate and multivariate analysis of clinical-pathological parameters associated with low survival rates

Parameters	Analysis (<i>P</i> value)	
	Univariate	Multivariate
Histological diagnosis (MC)	0.05*	0.18
Size (>5cm)	0.03*	0.18
Lymph node metastasis (Yes)	0.003*	0.09
Pulmonary metastasis (Yes)	< 0.0001*	0.39
Histological grade (II-III)	0.007*	0.42
Inflammatory distribution (multifocal)	0.04*	0.07
Inflammatory intensity (moderate/intense)	0.71	ND
Lymphocytic infiltrate (≥ 600 lymphocytes)	0.002*	0.02*

% of CD4⁺ (≥66.7%), CD8⁺ T-cells (<33.3%) 0.12 ND

* Selected for multivariate analysis. ND = not done. The end point was the animal death or discharge during the follow-up period

Table 4 –Association between clinical-pathological and parameters with distinct intervals of lymphocytic infiltrate intensity

Parameters		Lymphocytic infiltrate		<i>P</i> [#]
		<600 lymphocytes	≥600 lymphocytes	
Histological Diagnosis	MC-BMT	20	11	0,39
	MC	10	10	
Size	3-5cm	12	06	0,55
	>5cm	18	15	
Lymph node metastasis	No	21	08	0,04*
	Yes	9	13	
Clinical stage	II-IV	30	13	0,003*
	V	00	08	
Histological grade	I	20	10	0,15
	II-III	09	12	

* Significant differences at P<0.05. [#]Fisher's exact test.

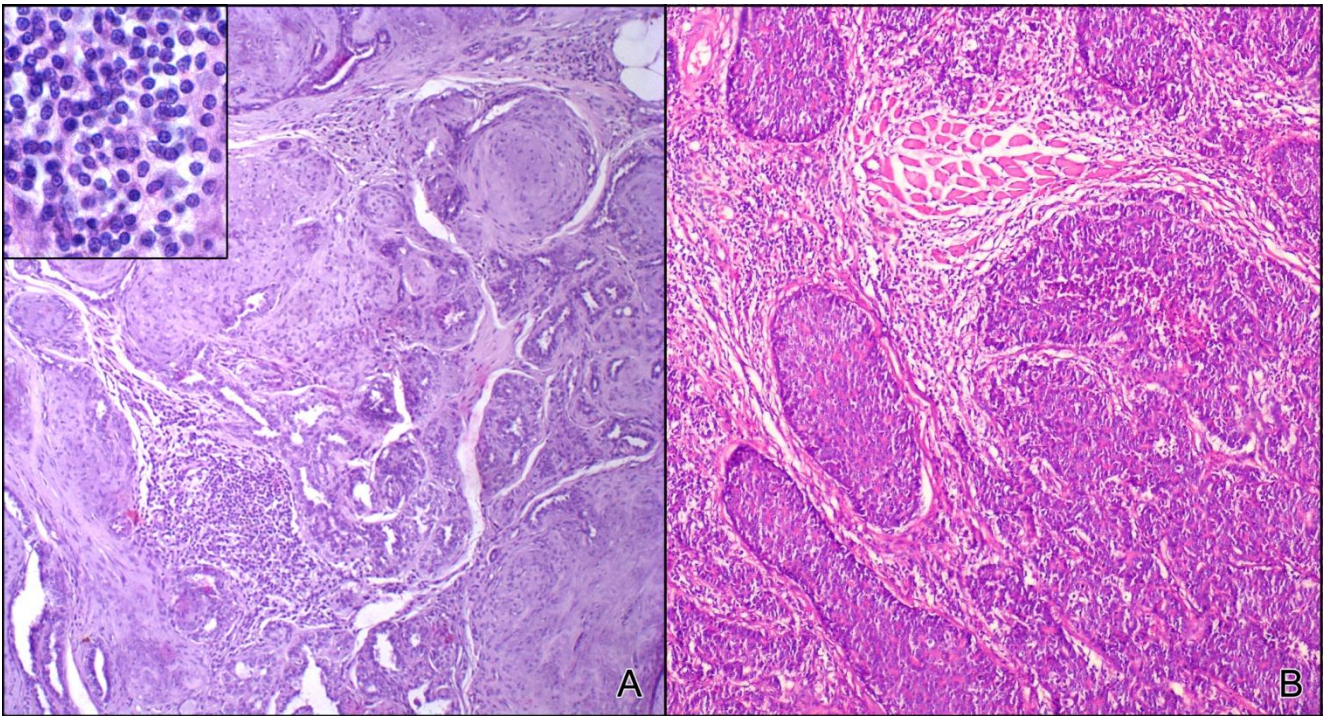


Figure 1 Histological diagnosis of canine mammary carcinoma samples. Low-power view of tumor specimen classified as carcinoma in benign mixed tumor (MC-BMT) associated with multifocal lymphocytic infiltrate, 200× (A); Higher power view of infiltrating lymphocytes in MC-BMT 600× (A-Inset); Low-power view of tumor specimen classified as mammary carcinoma (MC) in solid type associated with diffuse lymphocytic infiltrate, 200× (B). Histological sections (4 μm) underwent hematoxylin-eosin (HE) staining.

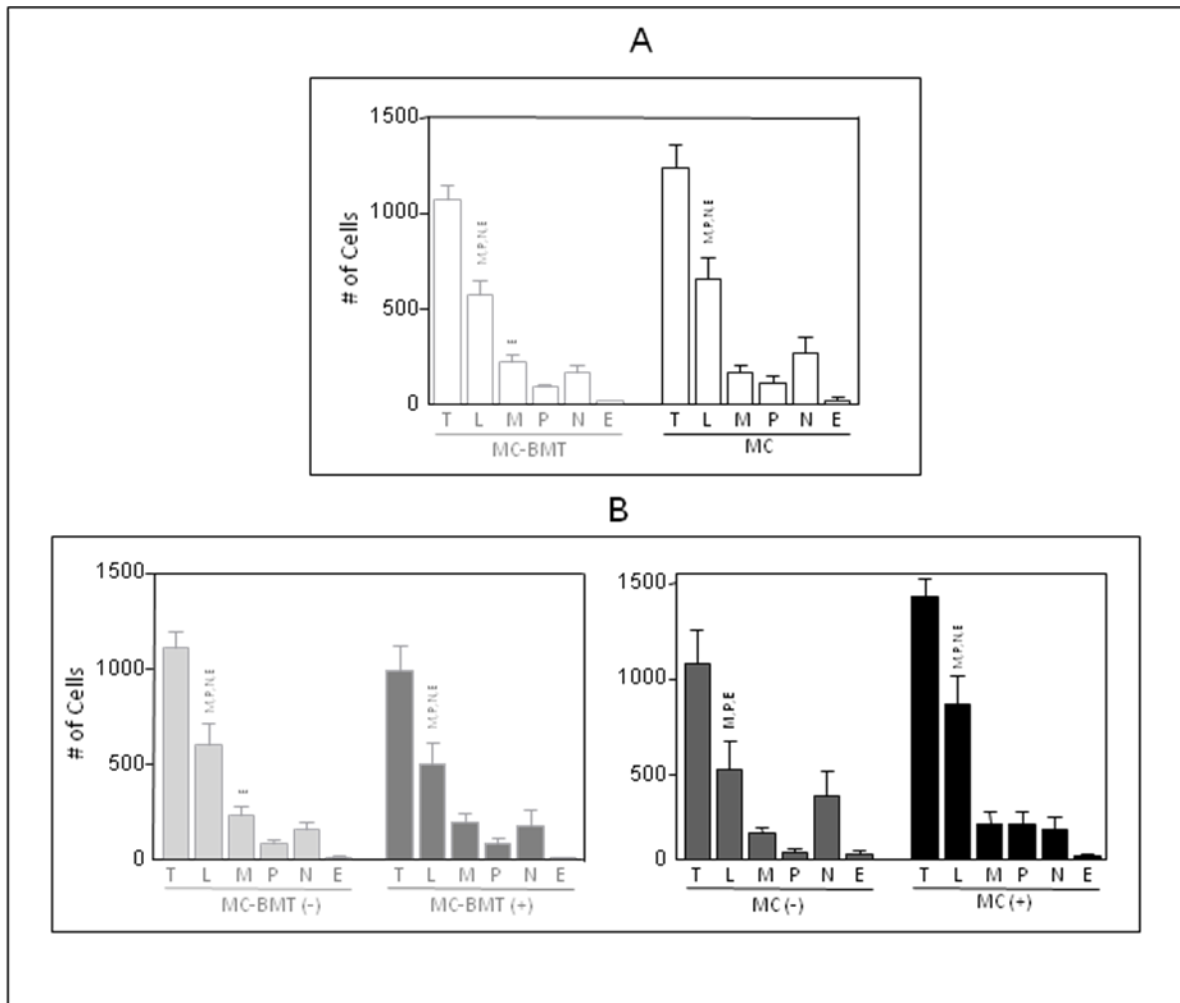


Figure 2 Composition of inflammatory infiltrate associated with canine mammary carcinoma. Infiltrating leukocyte populations from MC-BMT or MC (A), further subcategorized according to the absence (-) or presence (+) of lymph node metastasis (-) (B). The inflammatory cells were characterized by image analysis as described in Material and Methods. Data were expressed as number of cells (#) per eight "Hot Spots" histological fields. Significant differences at $p < 0.05$ are highlighted by asterisk.

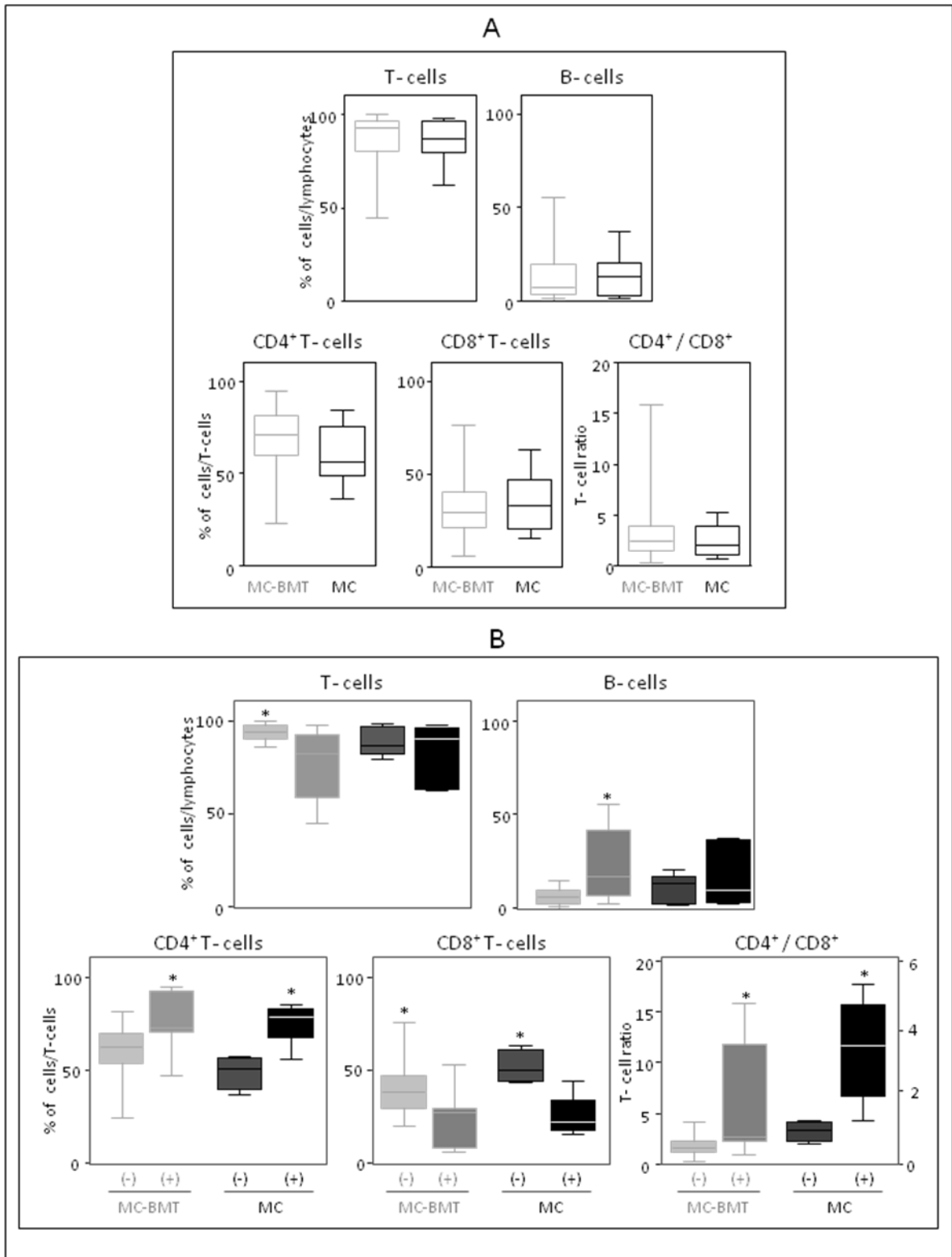


Figure 3 Immunophenotypic profile of tumor infiltrating lymphocyte in canine mammary carcinomas. Analysis of tumor infiltrating T-cells, B lymphocytes and T-cell subsets from MC-BMT or MC (A), further subcategorized according to the absence (-) or presence (+) of lymph node metastasis (-) (B). Lymphocyte populations and subsets were identified by flow cytometric immunostaining as described in Material and Methods. Data were expressed as percentage of positive cells within gated lymphocytes and CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio. Significant differences at $p < 0.05$ are highlighted by asterisk.

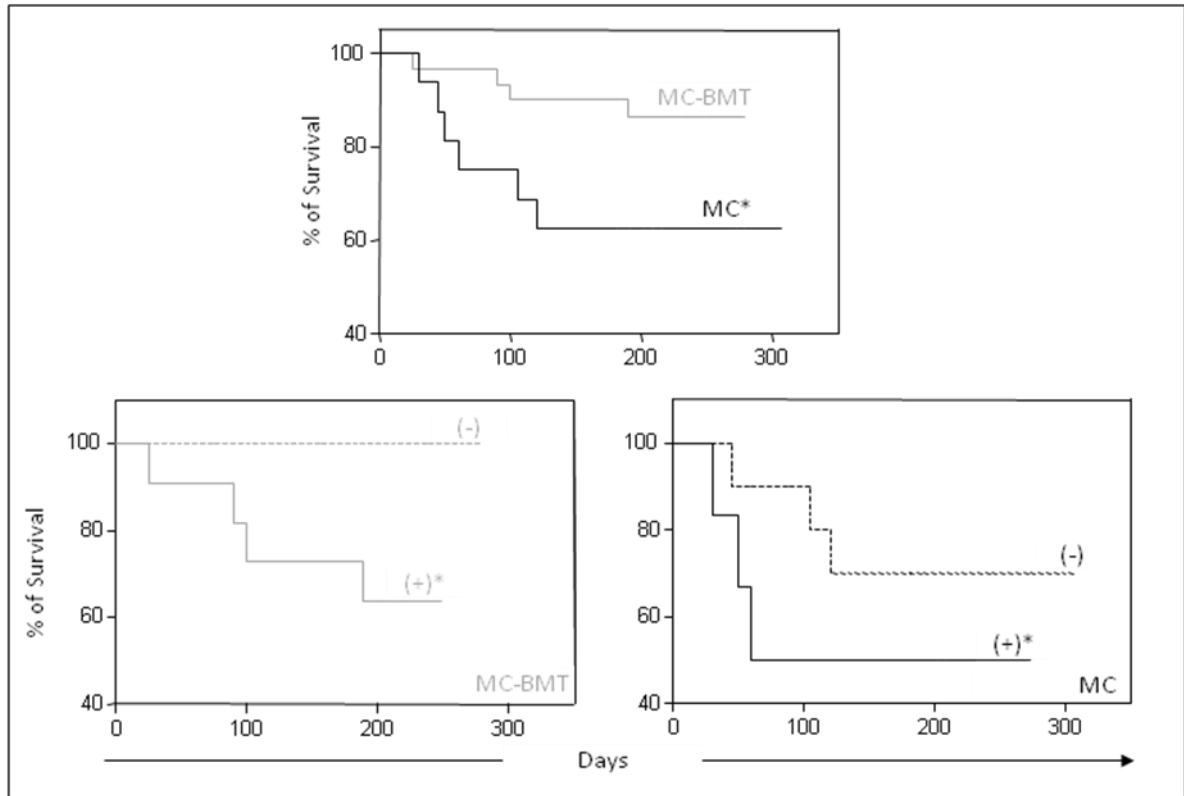


Figure 4 Survival rates of animals with canine mammary carcinoma. Kaplan-Meier survival curves for animals from MC-BMT or MC (top panel), further subcategorized according to the absence (-) or presence (+) of lymph node metastasis (-) (bottom panels). Animals were submitted to quarterly follow-ups during twelve months and survival rates (%) expressed in days between the surgical excisions of the end of follow-up as described in Methods. The survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method followed by Log-rank test and significant differences at $p < 0.05$ highlighted by asterisk.

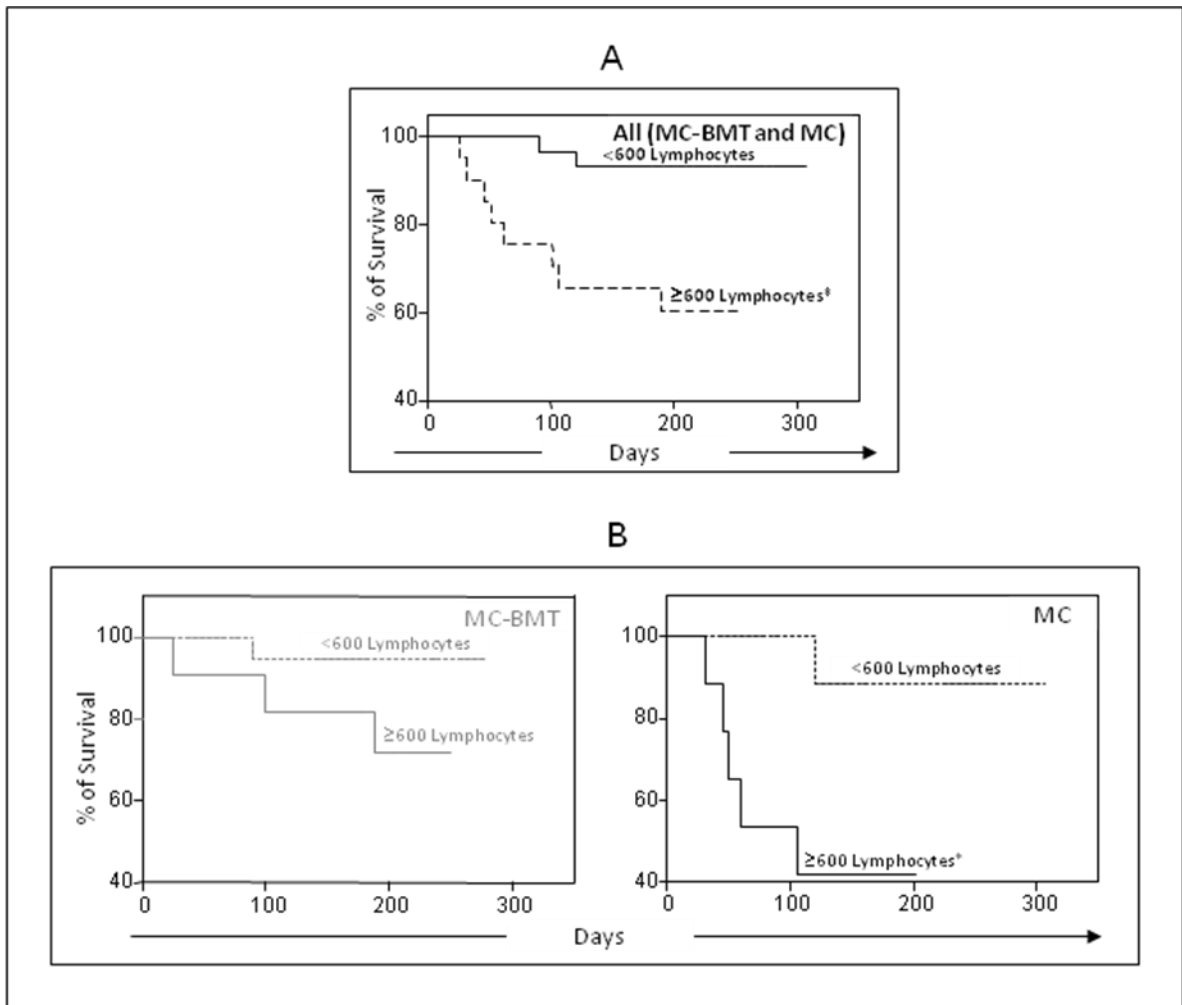


Figure 5 Survival rates of animals with canine mammary carcinoma. Kaplan-Meier survival curves for All (MC-BMT and MC) animals (A) categorized according to the lymphocytic infiltrate intensity (<600 and ≥ 600 lymphocytes) further sub grouped according to the histological diagnosis (MCBMT or MC) (B) (bottom panels). Animals were submitted to quarterly follow-ups during twelve months and survival rates expressed in days between the surgical excisions of the end of follow-up as described in Methods. The survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method followed by Log-rank test and significant differences at $p < 0.05$ highlighted by asterisk.

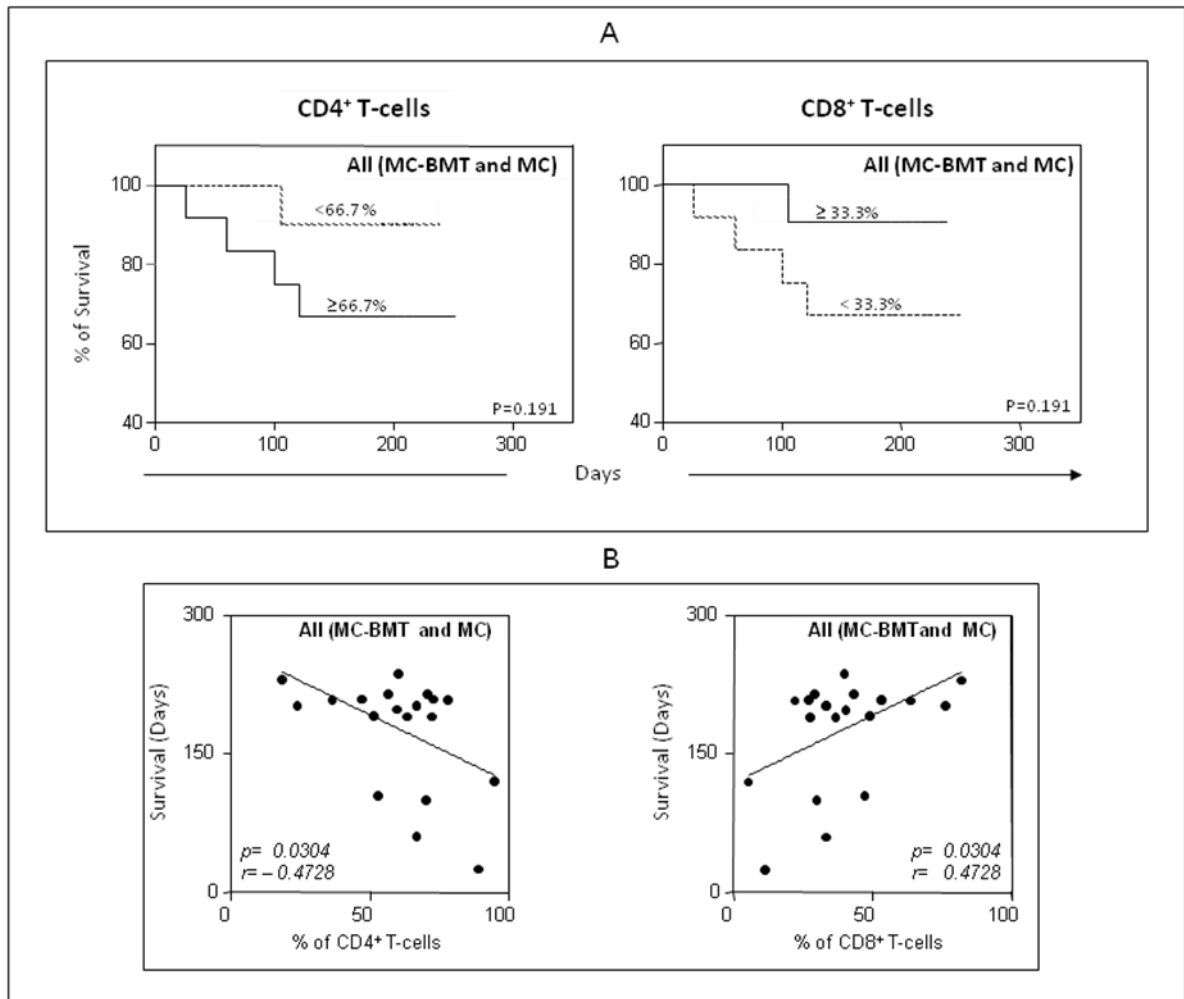


Figure 6 Survival rates of animals with canine mammary carcinoma. Kaplan-Meier survival curves for animals for All (MC-BMT and MC) animals categorized according to the relative percentage of CD4⁺ T-cells (<66.7% or ≥ 66.7%) and CD8⁺ T-cells (≤ 33.3% or >33.3%) (A). Animals were submitted to quarterly follow-ups during twelve months and survival rates expressed in days between the surgical excisions of the end of follow-up as described in Methods. The survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method followed by Log-rank test. Correlation analysis highlighted the significant association between the percentages of CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells with the animal survival in days (B).

ARTIGO 2

Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers

Aceito para publicação no periódico *Breast Cancer Research and Treatment*, em
Março de 2011

Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers

Alessandra Estrela-Lima^{1,2,3}; Márcio Sobreira Silva Araújo³; João Moreira da Costa-Neto²; Lorena Gabriela Rocha Ribeiro²; Karine Araújo Damasceno¹; Mário Jorge Melhor Heine D'Assis²; Olindo Assis Martins-Filho^{3*}; Andréa Teixeira-Carvalho³; Rogéria Serakides⁴; Giovanni Dantas Cassali¹

¹Laboratório de Patologia Comparada, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, Caixa Postal 486, 31270-901 Belo Horizonte - MG, Brasil

²Departamento de Patologia e Clínica, Escola de Medicina Veterinária – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.

³Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

⁴Departamento de Clínica e Cirurgia, Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Corresponding author:

*Olindo Assis Martins-Filho, e-mail address: oamfilho@cpqrr.fiocruz.br

Tel.: +55 31 33497764; fax: +55 31 32953115.

Abstract

We have evaluated the phenotypic features of peripheral blood leukocytes as putative novel biomarkers with prognostic values to monitor canine mammary carcinomas. Female dogs were categorized into distinct groups, referred as mammary carcinoma in benign mixed tumor-MC-BMT and mammary carcinoma-MC. Our findings demonstrates that decreased percentage of B-cells along with increased frequency of NK-cells, CD8⁺T-cells and CD8⁺CD5^{Low+}T-cells along with higher T/B-cells but lower CD4⁺/CD8⁺ ratio were the hallmarks of MC-BMT. Despite the lower expression of MHCI and MHCII, the lymphocytes from MC-BMT and MC displayed higher migration potential as suggest by enhanced frequency of CD18⁺ events. Although increased levels of macrophage-like cells/(CD14⁺CD16⁺) and decreased of MHCII expression were a common phenotypic feature in mammary carcinoma, down-regulation of MHCI was selectively observed in MC. Decreased frequency of CD4⁺ T-cells with increased levels of CD8⁺ T-cells and lower CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio were relevant biomarkers of MC-BTM(-). Although decreased expression of MHCI by monocytes was observed in MC-BTM regardless the presence of lymph node metastasis, this phenotypic feature was restricted to MC free of metastasis. The CD4⁺/CD8⁺ T-cells ratio lower than 1.8 was elected as a valid parameter with outstanding performance to predict survival in MC-BMT. On the other hand, the MHCI expression by monocytes higher than 10²mfi showed good value to estimate worse outcome in MC. These results should help to improve our understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas and provide tools for the determination of cut-off scores of clinically relevant immunophenotypic prognostic biomarkers.

Key Words

Canine mammary carcinoma, CD4⁺/CD8⁺ ratio, MHCI monocytes, prognosis, biomarkers.

Abbreviations

MC-BMT: Mammary carcinoma in mixed tumors
MC: Mammary carcinoma
C: control group
(+): presence of metastasis

(-): absence of metastasis
mAbs: Marker monoclonal antibodies
RT: Room temperature
MHC: Major histocompatibility complex
APC: antigen presenting cell

Background

Mammary cancer is among the most prevalent of canine tumors frequently resulting in death due to metastatic disease [1-3]. Several lines of evidences indicate that intrinsic patterns of host immune response may ‘guide’ the cancer progression towards distinct histological grade and/or distant metastasis [4].

Although the role of the innate and adaptive immunity in breast cancer involve complex interactions and are is still paradoxical [5-7], the knowledge of distinct immunophenotypic patterns associated with the clinical and biological aspects of mammary carcinomas may contribute to the establishment of relevant prognostic biomarkers.

The hypothesis that the immune system has a causal role in breast cancer etiology is supported by experimental, epidemiologic, preclinical, and clinical research [4,8]. Studies focusing on the tumor microenvironment have demonstrated that inflammation correlates with increased invasiveness and poor prognosis in breast cancer patients [9-11]. We have recently described that the lymphocytic infiltrate intensity was an independent biomarker of poor prognosis in canine mammary carcinomas [12]. Understanding the complex immunological profile associated with clinical aspects of breast cancer is the first step to establish biomarkers to monitor tumor progression [8, 13, 14]. As the clinical, biological and immunological features of canine mammary carcinomas may resemble those observed in women breast carcinomas [3,15-20] the data presented in this study may represent a plausible comparative model to establish putative biomarkers for prognosis purposes in human investigations.

Animals, Material and Methods

All procedures in this study were according to the guidelines set by the *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA). This study was approved by the Ethical Committee for the use of Experimental Animals of the *Universidade Federal de Minas Gerais*, Brazil (CETEA). The data are presented according to the REMARK recommendations [21].

Groups of animals

Fifty-nine purebreds or mixed-breed female dogs with age ranging from of 8-18 years were selected for this study, including 49 dogs with mammary carcinomas and 10 healthy controls, admitted at the Veterinarian Hospital of the *Universidade Federal da Bahia* (UFBA) were selected between October, 2008 to August, 2009.

The animals were submitted to clinical anamnesis was carried out by detailed evaluation of physiological parameters, analysis of historical evolution and reproductive records along with hematological analysis. All female dogs, regardless of hematological results, underwent abdominal and pelvic cavity ultrasound following clinical examination. This exam aimed to search for possible metastases, and verify the reproductive condition (intact or castrated) these animals. No uterine alterations suggestive of a pyometra diagnosis were observed.

The animals with mammary neoplasm were submitted to macroscopic evaluation to determine tumor features (including size, presence of inflammatory reaction and/or ulceration) and location. Inguinal and axillary lymph nodes were macroscopically evaluated by palpation and surgically removed during mastectomy. Presence or absence of neoplastic involvement was subsequently determined by histopathological analysis.

The animals with mammary tumor ≥ 3 cm in size were selected and submitted to mastectomy and the tumor samples classified based on the histopathological diagnosis according to Misdorp *et al.* [22] complemented by the proposal of Cassali *et al.* [23] for classification of micropapillary carcinoma. Following histopathological analysis the animals were subdivided into two groups referred as: i) carcinoma in benign mixed tumors (MC-BMT, n = 29) and ii) mammary carcinoma (MC, n = 20). Further histological analyses of inguinal and axillaries lymph node were used to categorize MC-BMT and MC into two subgroups referred as: i) (-) without lymph node metastasis, including clinical stage II-III [MC-BMT (-), n = 17; MC (-), n = 10] and ii) (+) with lymph node metastasis, including clinical stage IV-V [MC-BMT (+), n = 12; MC (+), n = 10]. The Clinical stage is determined

from information on the size tumor (T), involvement of regional lymph node (N) and the presence or absence of distant metastases (M). Stages # II, III, IV and V were defined based on TNM system previously describe by Owen [24].

Forty-six animals were elected for the survival analysis [MC-BMT, n = 26; MC, n = 20]. These animals were submitted to quarterly follow-ups during twelve months, including systematic clinical evaluation, radiological examinations along with biochemical and hematological analysis. Survival rates were expressed in days between the surgical excisions of the end of follow-up. None of the female dogs had prior use of anti-neoplastic drugs, anti-inflammatory drugs or antibiotics within the 30 days prior to surgical excision. After owner permission, deceased animals were subjected to necropsy and organ histopathology, in the Department of Pathology/HOSPMEV-UFBA to determine cause of death and detection of possible metastases. These animals showed a significant haemothorax, with respiratory failure as the cause of death, resulting from pulmonary metastasis of mammary carcinomas.

The control group (C) consisted of health dogs attended for routine clinical appointments with no evidences of mammary tumor or other disease detected during clinical examination and historical records analysis. Major features of the study population are summarized in Table 1.

Blood samples

Whole blood samples were collected upon clinical appointment and therefore before the mastectomy performed in the groups of dogs with mammary neoplasias. Blood samples constituted of 5ml of peripheral blood using EDTA as the anticoagulant (final concentration of 1 mg/mL). Hematological parameters and immunophenotypic analyses were processed using an automated blood cell analyzer (ADVIA® 60, Bayer HealthCare, Tarrytown, NY, USA) and a flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), respectively.

Immunophenotyping of canine whole blood leukocytes by flow cytometry

Immunophenotyping analyses of canine peripheral blood through flow cytometry were carried out described by Araujo *et al* [25]. Briefly, using 12mm×75mm polystyrene tubes, 30µL aliquots of whole EDTA peripheral blood were incubated at room temperature (RT) for 30 min, in the dark, with 30 µL of fluorochrome-labeled anti-canine cell surface marker monoclonal antibodies (mAbs), previously diluted in PBS-W (phosphate buffered

saline 0.15M, pH 7.2, supplemented with 0.5% of bovine seric albumin and 0.1% of sodium azide, all purchased from Sigma, St Louis, MO, USA).

Afterwards, the erythrocytes were lysed by adding 3mL of lysis solution (FACS brand lysing solution; Becton Dickinson San Diego, CA, USA) followed by incubation for 10 min at RT. Canine whole blood leukocytes were then washed twice with 2mL of PBS (phosphate buffered saline 0.15 M, pH 7.2) and centrifuged at 400g for 10 min at RT. After the washing procedures, labeled cells were then fixed for 30 min at RT, with 200 μ L of FACS FIX solution (10.0 g/L paraformaldehyde; 10.2 g/L sodium cacodylate and 6.65 g/L sodium chloride, pH 7.2, all purchased from Sigma, St Louis, MO, USA) prior analysis in the flow cytometer. Each assay included an internal control for autofluorescence in which the cells were incubated only in the presence of PBS-W.

Flow cytometric measurements were performed on a FACScalibur instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The Cell-Quest software package was used in both data acquisition and analysis. A total of 10,000 events were acquired for each preparation.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software package (San Diego, CA, USA). The comparative analyses of nonparametric data between groups (C, MC-BMT and MC) were performed by Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-test to compare all pairs of samples. For parametric data, the “one way” analysis of variance (ANOVA) followed by Student’s T-test were used. Pearson correlation was used to evaluate associations between specific cell phenotypic features (CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in MC-BMT and MHCI expression by monocytes in MC) with survival span (days). The survival curves were estimated with the Kaplan-Meier estimation method followed by Log-rank test. In all cases, the differences were considered significant at $p < 0.05$.

Performance indexes were used to determine whether the selected immunophenotypic features (CD4⁺/CD8⁺ T-cells ratio in MC-BMT and MHCI in monocytes in MC) would contribute as prognosis biomarker for canine mammary carcinoma monitoring. The receiver operating characteristic curve (ROC curve, Greiner *et al.* [26] was used to select the best cut-off value for CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio and MHCI expression by monocytes to discriminate distinct evolution to death or survival. The performance analysis included: the global accuracy was also evaluated by taking the area under the ROC curve (AUC) as proposed by Swets [27]. Co-positivity (Co-pos) = [true positives / (true positive

samples + false negative samples)] x 100; Co-negativity (Co-neg) = [true negatives / (true negative samples+ false positive samples) x 100; Positive predictive value – PPV = (true positive samples/ total of positive samples) x 100; Negative predictive value – NPV = (true negative samples/ total of negative samples) x 100; Positive Likelihood ratio (LR+) = Co-positivity / (1 – Co-negativity); Negative Likelihood ratio (LR-) = (1 – Co-positivity) / Co-negativity).

Results

Neutrophilic leukocytosis with normal levels of mononuclear cells was the most relevant hematological finding in canine mammary carcinoma

Besides the lower levels of red blood cell counts, the neutrophilic leukocytosis with normal levels of mononuclear cells was the most relevant hematological finding in canine mammary carcinoma (Table 2).

Decreased levels of circulating B-cells with increased frequency of NK-cells, CD8⁺ T-cells and CD8⁺CD5^{Low+} T-cells along with higher T/B-cells but lower CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio are the hallmarks of MC-BMT

Despite no significant differences observed in the percentage of circulating CD3⁺T-cells decreased frequency of peripheral blood B-cells with consecutive increase in the T/B-cell ratio was observed in MC-BMT group (Fig. 1).

Regardless the unaltered frequency of CD4⁺ T-cells, higher percentage of CD8⁺ T-cells, specially CD8⁺CD5^{Low+} T-cells along with lower CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio were observed in MC-BMT as compared to uninfected controls (Fig. 1). Interestingly, the MC-BMT group showed increased percentage of CD16⁺ NK-cells (Fig. 1).

Despite the lower expression of MHCI and MHCII by peripheral blood lymphocytes from mammary carcinoma female dogs, these cells displayed higher migration potential as suggest by enhanced frequency of circulating CD18⁺ events

Both MC-BMT and MC displayed significantly higher percentage of CD18⁺ cells in comparison to the control group (Fig. 2). However, lower expression of MHCI and MHCII

was observed in circulating lymphocytes, with evident down-regulation of MHCII on circulating B-cells (Fig. 2).

Although increased levels of macrophage-like cells ($CD14^+CD16^+$) and decreased of MHCII expression are a common phenotypic feature in peripheral blood monocytes of female dogs with mammary carcinoma, down-regulated expression of MHCI is selectively observed in MC-BMT

Analysis of circulating monocytes revealed significant increase in the frequency of $CD16^+$ monocytes (macrophage-like cells) with down-regulation of MHCII in both clinical groups (Fig. 3). However, down-regulation of MHCI expression in monocytes was selectively observed in MC-BMT (Fig. 3).

Decreased frequency of $CD4^+$ T-cells with increased levels of $CD8^+$ T-cells leading to lower $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratio are relevant biomarker associated with MC-BTM free of lymph node metastasis commitment

Analysis of immunophenotypic features following subgroup categorization based on the absence (-) or presence (+) of lymph node metastasis (Fig. 4) showed a lower percentage of $CD4^+$ T-cells with increased levels of $CD8^+$ T-cells leading to lower $CD4^+/CD8^+$ T-cells ratio in MC-BMT(-) as compared to the control group (Fig. 4). Immunophenotypic features of circulating monocytes revealed lower percentage of $CD18^+$ events selectively in MC-BMT(+) (Fig. 4).

Although decreased expression of MHCI is observed in monocytes from MC-BTM regardless the presence of lymph node metastasis, in MC this phenotypic feature is restricted to female dogs free of metastasis commitment

Additional analysis of circulating monocytes revealed that despite the down-regulation on MHCI expression was a common feature in both MC-BMT(-) and MC-BMT(+), lower expression of this molecule was found selectively in MC(-) (Fig. 4).

Lower mean survival and decreased survival rates was observed in MC-BMT female dogs with $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratio >1.8

We have elected the $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratio as a good biomarker to monitor MC-BMT outcome. The establishment of a cut-off edge ($CD4^+/CD8^+=1.8$) to segregate survival and death ending point in MC-BMT was able to highlight significant differences, where

female dogs with $CD4^+/CD8^+$ ratio ≤ 1.8 displayed higher mean survival as compared to those with $CD4^+/CD8^+$ ratio >1.8 (Fig. 5).

Analysis of Kaplan-Meier survival curves further validate these findings, demonstrating that animals with $CD4^+/CD8^+$ ratio >1.8 had significantly lower survival rate. Additional correlation analysis also corroborates these results (Fig. 5).

Performance analysis elected the $CD4^+/CD8^+$ T-cells ratio cut-off of 1.8 as an edge to segregate with outstanding indexes the survival or death outcome in MC-BMT

Analysis of performance indexes showed outstanding global accuracy value (AUC=0.92), negative predictive value (NPV=100%) and $LR^- = -\infty$ (Fig. 5). Together, these indexes demonstrated that the use of $CD4^+/CD8^+$ T-cell ratio is a good prognostic biomarker to monitor females with MC-BMT. In other words, a MC-BMT female dog that has $CD4^+/CD8^+$ ratio ≤ 1.8 is about infinite times more likely to survive than a female dog that does not have such result (Fig. 5).

Lower mean survival and decreased survival rates was observed in MC female dogs with MHCI expression in monocytes $>10^2$ mfi

We elected the MHCI expression by monocytes as a plausible biomarker to predict the tumor outcome. The establishment of a cut-off edge (MHCI= 10^2) to segregate survival and death ending point in MC was capable to show significant differences, where female dogs with MHCI expression by monocytes $\leq 10^2$ displayed higher mean survival as compared to those with MHCI expression by monocytes $>10^2$.

Analysis of Kaplan-Meier survival curves demonstrated that MC with MHCI expression by monocytes $>10^2$ had significantly lower survival rate and Pearson's correlation analysis further corroborates these findings (Fig. 6).

Performance analysis suggested that the cut-off of 10^2 mfi for the expression of MHCI expression by monocytes is an applicable limit to segregate with good quality indexes the survival or death outcome in MC

Analysis of performance indexes of MHCI expression by monocytes as a prognosis biomarker supported our results, showing moderate global accuracy value (AUC=0.68), positive predictive value (PPV=100%) and $LR^+ = +\infty$ (Fig. 6). These data support the good performance of this biomarker and confirmed the selection of the cut-off edge (Fig.6).

Discussion

Mammary carcinomas are the most common tumors in the female dog [1, 28-30]. One of the most relevant challenges in canine carcinomas follow-up is the low accuracy of biomarkers for postsurgical prognosis. Usually, prognosis is based on several tumor and host characteristics, including the histological type [1, 31-33], tumor grade and stage [19, 33-35], along with distinct aspects of host immune response.

Regardless the use of distinct methods (histological or nuclear) to establish the tumor grading as a prognostic factor in mammary carcinoma, such analysis usually presented an element of subjectivity, resulting in reduced reproducibility between results obtained by independent analysts [35-37]. The histological grading has been pointed a more objective prognostic indicators of tumor malignancy [35- 39] and the clinical/histopathological parameters together provide valuable information regarding diagnosis, prognosis and therapy [40].

The outcome of an immune response toward an evolving breast neoplasm is largely determined by the type of immune response elicited [4]. The intra-tumor mononuclear cell infiltrate consists largely of T-lymphocytes with few B-cells and variable numbers of macrophages and NK-cells[4, 41- 44]. In our previous findings lymphocytes represented the predominant cell type in the tumor infiltrate [12]

In the present investigation, we have searched for novel biomarkers to be used as complementary propedeutic prognostic factors. The analysis of hematological parameters in this investigation showed that the tumor-bearing animals presented significant reduction in the number of red blood cells and increase in the number of leukocytes. Over expression of certain inflammatory cytokines results in shortened survival of red blood cells, suppression of erythroid progenitor cells, impaired iron utilization, and inadequate erythropoietin production [45]. Anemia in cancer patients has been shown to be highly associated with decreased quality of life in a patient with cancer, decreased therapeutic response and progression of neoplastic patient [46]. Neutrophils were the predominant white blood cells type in Clinical/Histological Groups (MC-BMT and MC). We believe that the observed neutrofilia is a result of extensive ulceration areas in tumors and the presence of neutrofilis in the inflammatory infiltrate is related to a poorer prognosis, since larger tumors, metastasis and cases evolving to death presented higher increases of this cell.

The number of eosinophils was significantly higher in MC group. Many types of human cancer are associated with extensive eosinophilia [48,49]. Chemotaxis for eosinophils by T-lymphocytes and antigen/antibody complexes has been described. It is suggested that immune complex formation with tumor antigen may produce large amounts of C3a, with subsequent histamine release [49]. Eosinophils may play an important role in the host interaction with the tumor, perhaps by promoting angiogenesis and connective tissue formation adjacent to the cancer [50].

The number of T-cells is reduced in peripheral blood of patients with breast cancer, especially in locally advanced and metastatic forms [9,13,51]. However studies of T-lymphocyte subpopulations have shows differences in T-lymphocytes counts depending on tumor stage [10, 11]. In dogs with lymphoma the percentages T-cells were markedly decreased and B-cells markedly increased in dogs in comparison with the control group [52]. In this study, the percentages of peripheral blood lymphocyte subpopulations did not show significant difference in the percentage of T-lymphocytes and CD4⁺ T-cells between the clinical groups (C, MC-BMT and MC). However, there was a significant higher percentage of CD8⁺ CD5^{Low+} T-cells in MC-BMT suggesting a putative protective role of these cells, controlling the tumor development.

This singular T-cell subset expressing low density of CD5⁺ marker, but an overall unaltered expression of CD3⁺ has been previously described[25]. It has been suggested that the CD5^{Low+} lymphocyte subset from porcine and bovine species contains the NK-cell like activity [53] and it has been suggested as a putative phenotypic marker for an IL-2-dependent canine NK-cell enrichment [54]. Moreover, it has been demonstrated that this subset of canine CD8⁺ T-cells derived from peripheral blood lymphocytes referred as lymphokine (IL-2)-activated killers (LAKs) contain substantially higher levels of mRNAs for NK cell-related receptors [55].

Some studies have pointed out that, the acute activation of B-cells may have a key role in early elimination of neoplastic cells, through the secretion of antigen-specific immunoglobulins, thus participating in the regression of tumors [5, 56]. However, other studies have demonstrated that chronic activation of B-cells contributes to tumor development by inhibiting the activity of CD4⁺ T-cells [56]. In our recent investigation, we have demonstrated that high levels of tumor infiltrating B-cells were observed in animals with worse prognosis [12].

We have also observed a higher percentage of NK-cells in MC-BMT, suggesting a possible protective anti-tumoral role for these cells. The tumoricidal capacity of NK-cells

can be increased by cytokines, including interferon, IL-2 and tumor necrosis factor-alpha [57]. Even in the absence of previous sensitization, NK-cells can kill tumor cells that lack or have modified MHC class I surface molecules [54]. The NK-cells exert an action independent of the expression of MHC and then are activated to eliminate the target cells depending of the balance between stimulating and inhibitory signals from its receptors [58].

Our data showed lower expression of MCHI and MHCII, including MHC class II expression in B-cells from MC group with worse prognosis. So far an effective immune response is necessary that the tumor cells express MCHI or MHCII molecules [59], since effective T-cell activation involves two sets of signals [60].

The analysis of circulating monocytes also revealed down-regulation of MCHI and MCHII in groups of dogs with poorer prognosis, confirming the attempt to evasion of tumor cells. Moreover, we observed a significant CD16 expression by monocytes in both clinical/histological with mammary carcinoma groups. These findings are in agreement with those reports of patients with cancer had a significantly elevated percentage of CD16 monocytes compared with controls [61]. These cells constitute the main subpopulation of blood monocytes involved in antitumor response [62].

Additional analysis regarding the absence/presence of lymph node metastasis revealed that the decreased proportion of CD4⁺ T-cells besides the higher percentage of CD8⁺ T-cells could be observed in MC-BMT (-). Upon encounter of a tumor cell antigen/HLA I complex for which their T cell receptor is specific, cytotoxic T lymphocytes clonally expand and subsequently differentiate. These activated cytotoxic T lymphocytes can mediate specific destruction of tumor cells by the release of these lytic components in case of direct cell-cell interaction. It is believed that while CD8⁺ T-cells play an important protective role controlling the tumor development, the CD4⁺ T-cells may present a dual role, participating with dichotomic specific immune response to the tumor, controlling or inducing the tumor progression depending on the production of distinct cytokines patterns [5, 6, 56, 63, 64]

More recently the tumor associated lymphocytes constitutes an independent prognostic and predictor indicator [12, 65, 66]. A well-established criterion for biomarker selection is classification accuracy [67]. In the present study were identified CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in MC-BMT and MCHI expression by monocytes in MC as possible biomarkers for laboratory monitoring of survival in dogs with mammary carcinoma. ***The area under the curve analysis showed that*** CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio presented elevated accuracy (0.9-0.99) while MCHI expression by monocytes presented low accuracy (0.5-0.69) second criterions established by *Swets [27]. Using the cut-off points of 1.8 and 100 for* CD4⁺/CD8⁺ T-cell

ratio and MHC I expression by monocytes, respectively, it *was observed significant negative correlation between* CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio *and survival and too* MHC I expression by monocytes *and survival*.

The evaluation of the performance indexes for CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio showed co-positivity (sensitivity) of 100%, co-negativity (specificity) of 81.8% and negative predictive value of 100%. These results showed this parameter is highly sensitive indicating its ability to detect in female dogs with mammary tumors classified as MC-BMT are more likely to survive or method contributes to the exclusion of death. The maintenance of the CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio has been pointed out as an important prognostic factor in the progression of human breast cancer [40].

The evaluation of the performance indexes for MHC I expression by monocytes showed co-positivity (sensitivity) of 36.4% co-negativity (specificity) of 100% and positive predictive value of 100%. The data analysis showed that MHC I expression by monocytes is parameter highly specific, indicating its ability to detect in female dogs with mammary tumors histologically classified as MC whose disease will progress to the death of the animal.

In conclusion, the data presented in this study strongly support that the analysis of phenotypic features of circulating leukocytes may represent relevant indicators laboratorial biomarkers that contribute as an alternative tool in monitoring the clinical course and survival in dogs with mammary carcinoma.

Acknowledgements

This work was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). ATC, OAMF, RS and GDC are grateful for CNPq research fellowship (PQ). The authors thank the program for technological development in tools for health - PDTIS - FIOCRUZ for use of its facilities

References

1. Misdorp W (2002) Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ (ed) Tumors in Domestic Animals. 4rd edn. Iowa State pp 575-606

2. Sorenmo K (2003) Canine mammary gland tumors. *Vet Clin N Am Small Anim Pract* 33:573- 596
3. Andrade FHE, Figueiroa FC, Bersano PRO, Bissacot DZ, Rocha NS (2010) Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology* 45:1-5
4. DeNardo DG, Coussens (2007) LM Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 9: 1-10
5. Coussens LM, Werb Z (2001) Inflammatory cells and cancer: think different! *Journal Experimental Medicine*. 6: 23-26
6. De Visser KE, Eichten A, Coussen L (2006) Paradoxical roles of the immune during cancer development. *Nature Reviews* 6:24-40
7. Yaqub S, Aandah EM (2009) Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Oncogenesis* 15: 43–63
8. Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson A, Martzen M, Torkelson C (2008) Breast cancer and the immune system. *J Soc Integr Oncol* 6: 158–168
9. Murta EFC, Andrade JM, Falcão RP, Bighetti, S. (2000) Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*, 86:403-407
10. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003) Increased populations of regulatory T Cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 9: 4404–4408
11. Tominaga M, Horiuchi Y, Ichikawa M, Yamashita M, Okano K, Jikumaru Y, Nariai Y, Kadosawa T (2010) Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. *J Vet Diagn Invest* 22:438–441
12. Estrela-Lima A, Araújo MSS, Costa-Neto JM, Teixeira-Carvalho A, Barrouin-Melo SM, Cardoso SV, Martins-Filho OA, Serakides R, Cassali GD (2010) Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* 10:1-14

13. Campbell MJ, Scott J, Maecker HT, Park JW, Esserman LJ (2005) Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 91:163–171
14. Kazbarienė, B (2009) Tumor and immunity. *Medicina (Kaunas)* 45:162-167
15. Prier JE, Brodey RS (1963) Canine Neoplasia. A Prototype for human cancer study. *Bull. Org. mond. and Bull. World Health Org.* 29:331-344
16. Peleteiro MC (1994) Tumores mamários na cadela e na gata. *Rev Port de Ciências Vet* 89:10-29.
17. Cassali GD, Gobbi H, Malm C, Schmitt FC (2007) Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology* 18:191-6
18. Genelhu MC, Cardoso SV, Gobbi H, Cassali GD (2007) A comparative study between mixed-type tumors from human salivary and canine mammary glands. *BMC Cancer* 7:1-9
19. Paoloni M, Khanna C (2008) Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature* 8: 147-156
20. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J; Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, Monica N, Rinaldis E (2009) Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 135: 1-20
21. LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst* 97:1180–1184
22. Misdorp W, Else RW, Hellmen E, Lipscomb T P (1999) Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. *Armed Forces Institute of Pathology and the American Registry of Pathology and The World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington DC*, pp. 11–29
23. Cassali GD, Serakides R, Gärtner F, Schmitt FC (2002) Invasive micropapillary carcinoma. A case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 54:366-369
24. Owen LN (1980) *TNM Classification of tumors in Domestic Animals*. World Health Organization, Geneva

25. Araújo MSS, Andrade RA, Vianna LR, Reis AB, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Mallo MN, Martins-Filho OA (2008) Despite leishvaccine and leismune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26: 2211-24
26. Greiner M, Sohr D, Göbel P (1995) A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Met.* 185:123-32
27. Swets JA (1988) Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Sci* 240:1285-1293
28. Kitchell, BE, Loar AS (1994) Diseases of the mammary glands. In: Morgan, RV (ed) *Handbook of Small Animal Practice*, 3rd edn, Philadelphia, pp 615–625
29. Morrison, WB (1998) Canine and feline mammary tumors. In: *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*, W. B. Morrison, Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 591–598
30. Davidson, E B (2003) Treatment of mammary tumors in dogs and cats. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*. Orlando
31. Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M (1996) Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science* 58:1079–1083
32. Fossum, TW (1997) *Small Animal Surgery*, Mosby-Year Book, St Louis. pp. 539–544
33. Williams, L (2003) Predictors of tumor response. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, Orlando, Florida. pp 679–681
34. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A (2005) Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a human grading method. *J. Comp. Path.* 2005, Vol. 133, 246–252
35. Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of the histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology* 19:403-410
36. Castagnaro M, Casalone C, Bozzetta E, De Maria R, Biolatti B, Caramelli M (1998) Tumor grading and the one-year post-surgical prognosis in feline mammary carcinomas. *J Comp Pathol* 119: 263–275

37. De Vico G, Sfacteria A, Maiolino P, Mazzullo G (2002) Comparison of nuclear morphometric parameters in cytologic smears and histologic sections of spontaneous canine tumors. *Veterinary Clinical Pathology* 31: 16–18
38. Pe´rez Alenza, M. D., Pen˜a, L., Del Castillo, N. and Nieto, A. I. (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 41: 287–291
39. Nieto A, Perez Alenza M D, Del Castillo N, Tabanera,E, Casta˜no M, Pe˜na L (2003) BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *Journal of Comparative Pathology* 128:260–268.
40. Sheu BC, Kuo WH, Chen RJ, Huang, KJ, Chow SN (2008) Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. *The Breast* 17:604-610.
41. Ben-Baruch A (2003) Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. *Breast Cancer Research* 31:31-36
42. O’Sullivan C, Lewis CE (1994) Tumour associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. *Journal Pathology* 172:229-235
43. Macchetti AH, Marana HRC, Silva JS, Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S (2006) Tumor-infiltration CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics* 61:203-208
44. Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, Ithnin H, Abdullah M, Davis WC, Seow HF (2006) Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Letters* 102: 229-236
45. Boehm DU, Lebrecht A, Schmidt M, Siggelkow W, Lindner C, Litz A, Ulbrich E, Koelbl H. (2007) Prognostic impact of haemoglobin levels in breast cancer. *Anticancer Res* 27:1223-6
46. Dubsky P, Sevelde P, Jakesz R, Hausmaninger H, Samonigg H, Seifert M, Denison U, Mlineritsch B, Steger G, Kwasny W, Stoger H, Bartsch R, Stierer M, Taucher S, Fridrik M, Schippinger W, Greil R, Potter R, Gnant M. (2008) Anemia Is a Significant Prognostic Factor in Local Relapse-Free Survival of Premenopausal Primary Breast Cancer Patients Receiving Adjuvant Cyclophosphamide/Methotrexate/ 5-Fluorouracil Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 14: 2082- 2087

47. Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR, Jorcyk CL (2005) Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Res* 65: 8896-904
48. Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS (1981) Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol* 34:1343-1348
49. Amini RM, Aaltonen K, Nevanlinna H, Carvalho R, Salonen L, Heikkilä P; Blomqvist C (2007) Mast cells and eosinophils in invasive breast carcinoma. *BMC Cancer* 7:1-5
50. Samoszuk M. (1997) Eosinophils and human cancer. *Histol Histopathol* 12(3): 807-12
51. Miescher S, Whiteside TL, Carrel S, Flidner VV (1986) Functional properties of tumor-infiltrating and blood Lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor Cells and their supernatants on proliferative responses of Lymphocytes 136:1899-1907
52. Winnicka A, Jagielski D, Hoffmann-Jagielska M (2002) Lechowski Cytometric evaluation of peripheral blood lymphocytes in dogs with lymphoma during chemotherapy. *R. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49:303-6
53. O'Reilly KL, Splitter GA. Biochemical and functional characterization of 8-10C5 (gp120,90), a novel molecule on the surface of bovine T leucocytes. *Immunology* 71: 434-4. (1990)
54. Huang YC, Hung SW, Jan TR, Liao KW, Cheng CH, Wang YS, Chu RM (2008) CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 1501-1510
55. Lin YC, Huang YC, Wang YS, Juang RH, Liao KW, Chu RM (2010) Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 133:144-53
56. Whiteside TL (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27:5904-5912
57. Orr MT, Lanier LL (2010) Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 142:847-856
58. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A (2002) Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 32:1205-11
59. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S (2001) Immune escape of melanoma: First evidence of structural alterations in two

- distinct components of the MHC Class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 61:8647–8650
60. Waldmann TA (2003) Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 9: 269-77
 61. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Louis M, Weiner LM, David H, Munn DH (1995) CD16+ Monocytes in patients with cancer: Spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 85:2910-2917
 62. Ziegler-Heitbrock L (2007) The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation *Journal of Leukocyte Biol* 8:584-592
 63. Stewart THM, Heppner GH (1997) Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitol* 115: 141-153
 64. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H (1998) The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Experim Med* 188:2357-2368
 65. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BA, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Toerne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. (2009) Tumor-Associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:105-113
 66. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, szewczyk K, Staszek U, Pudelko M, Bszynglarewicz b, Szelachowska j, Zolnierek , Kornafel J. (2009) The Prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res* 9: 2445-2452
 67. Huang Y, Pepe MSA (2009) Parametric ROC model-based approach for evaluating the predictiveness of continuous markers in case–control studies. *Biometrics* 65:1133–1144

List of Tables and Figures

Table 1. Pathological clinical features of study population

Parameters	TOTAL (n=49)	MC-BMT (n=29)	MC (n=20)
Lymph node metastasis	44.9% (22/49)	41.4% (12/29)	50.0% (10/20)
Size			
3-5cm	34.7% (17/49)	34.5% (10/29)	35.0% (07/20)
>5cm	65.3% (32/49)	65.5% (19/29)	65.0% (13/20)
Clinical Staging			
Stage II	34.6% (14/49)	27.6% (08/29)	30.0% (06/20)
Stage III	26.5% (13/49)	31.0% (09/29)	20.0% (04/20)
Stage IV	28.6% (14/49)	37.9% (11/29)	15.0% (03/20)
Stage V	16.3% (08/49)	3.4% (01/29)	35.0% (07/20)

Table 2. Hematological parameters in canine mammary carcinoma.

Hematological Parameter	Clinical/Histological Groups			
	Control	Canine Mammary Carcinomas		
		MC-BMT	MC	
Red Blood Cells ^a	6.7±0.6	5.7±1.4*	5.8±1.3*	
Platelets ^b	296.5±80.7	394.8±197.1	404.8±210.7	
White Blood Cells ^c	Total	10.0±3.1	16.6±9.4*	16.4±8.9*
	Neutrophils	6.5±2.2	13.2±10.8*	12.2±7.8*
	Eosinophils	0.3±0.1	0.6±0.4	0.9±0.5*
	Monocytes	0.2±0.1	0.5±0.5	0.3±0.3
	Lymphocytes	2.2±1.2	1.8±1.2	1.9±1.3

^a RBC are expressed as number x 10⁶/mm³ of blood.

^b Platelets are expressed as number x 10³/mm³ of blood.

^c White blood cell subpopulations are expressed as number x 10³/mm³ of blood.

*Significant differences at p<0.05.

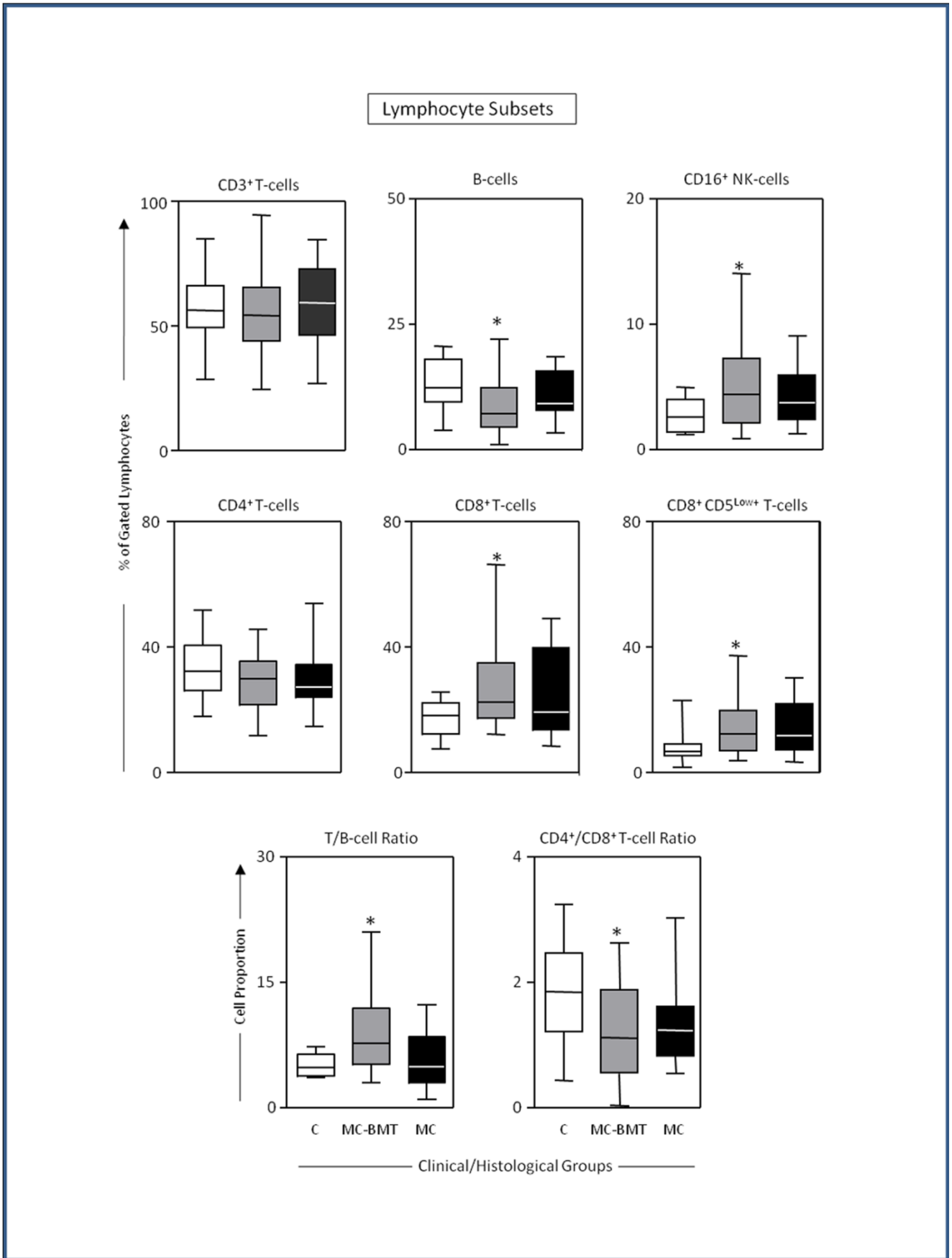


Fig.1

Fig. 1 LYMPHOCYTE SUBSETS in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas. Data analysis was carried out in healthy control female dogs (C=□) and female dogs with mammary carcinomas segregated into two clinical groups, according to the tumor histological classification: i) mammary carcinomas in benign mixed tumors (MC-BMT=□) and ii) mammary carcinomas (MC=■). Immunophenotypic analyses were carried out by dual color flow cytometry as described in Methods. Total lymphocytes were first selected based on their Size (laser-forward scatter - FSC) and granularity (laser side scatter - SSC) and subsets analyzed by quadrant statistics on FL1/FITC *versus* FL2/R-PE dot plots. The results are shown in box plot format showing the minimum, median and maximum values of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD8⁺CD5^{+LOW}, CD16⁺ NK-cells and B-lymphocytes (expressed in percentage of gated lymphocytes) and T/B and CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio (expressed in proportion). The box stretches from the 25th percentile to the 75th percentile and the median is shown as a line across the box. Significant differences at p<0.05 are indicated by asterisk as compared to the control group

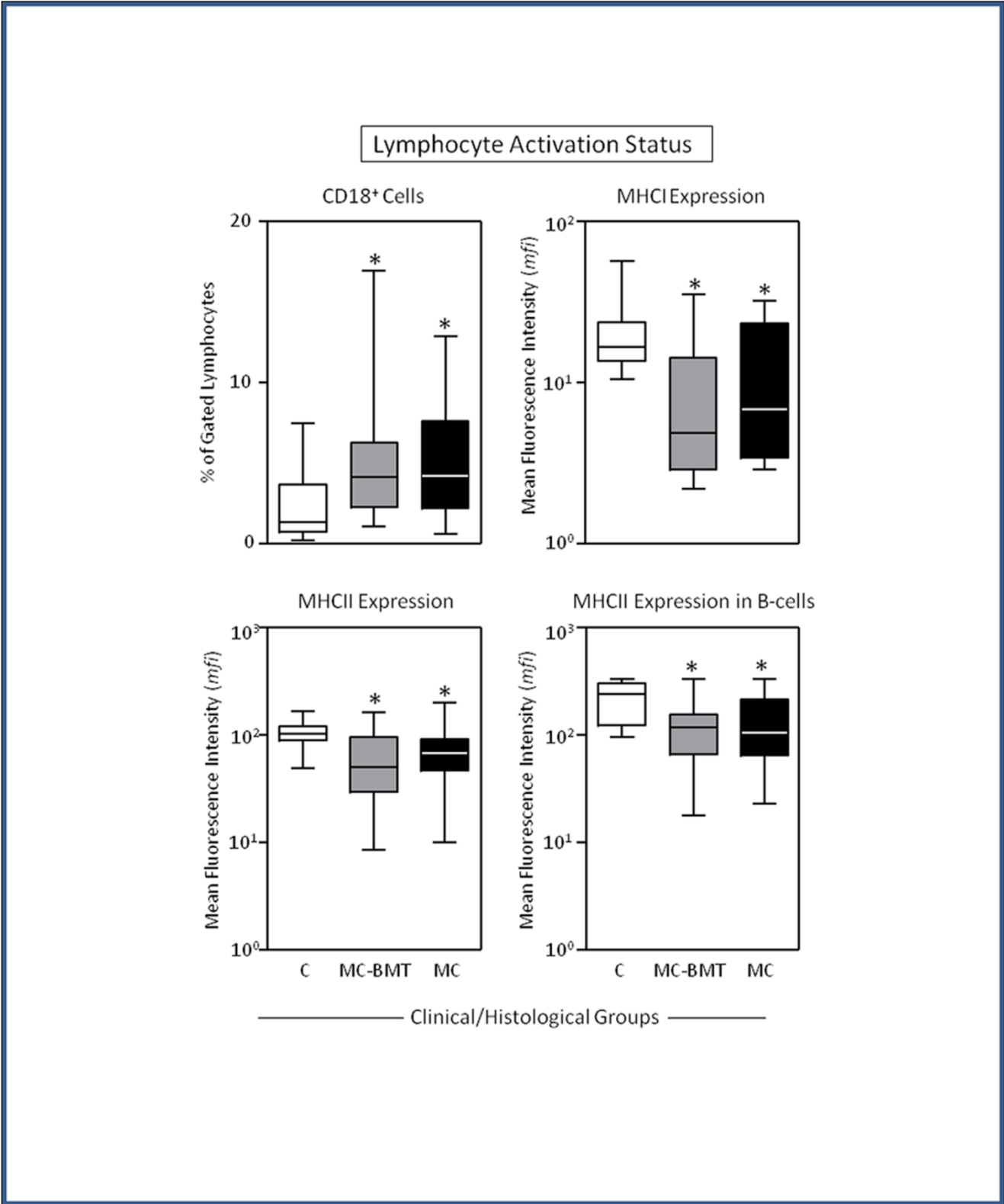


Fig.2

Fig. 2 LYMPHOCYTE ACTIVATION STATUS in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas. Data analysis was carried out in healthy control female dogs (C=□) and female dogs with mammary carcinomas segregated into two clinical groups, according to the tumor histological classification: i) mammary carcinomas in benign mixed tumors (MC-BMT=□) and ii) mammary carcinomas (MC=■). Immunophenotypic analyses were carried out by single and dual color flow cytometry as described in Methods. Total lymphocytes were first selected based on their Size (laser-forward scatter - FSC) and granularity (laser side scatter - SSC) and the activation status determined on FL1/FITC or FL2/R-PE histogram distributions (for total lymphocytes) or dual color FL1/FITC *versus* FL2/R-PE dot plots (for B-cell subset). The results are shown in box plot format showing the minimum, median and maximum values of CD18⁺ lymphocytes (expressed in percentage of gated lymphocytes), MCH I and MCH II expression (presented as mean fluorescence intensity - MFI). The box stretches from the 25th percentile to the 75th percentile and the median is shown as a line across the box. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by asterisk for the comparison between the groups

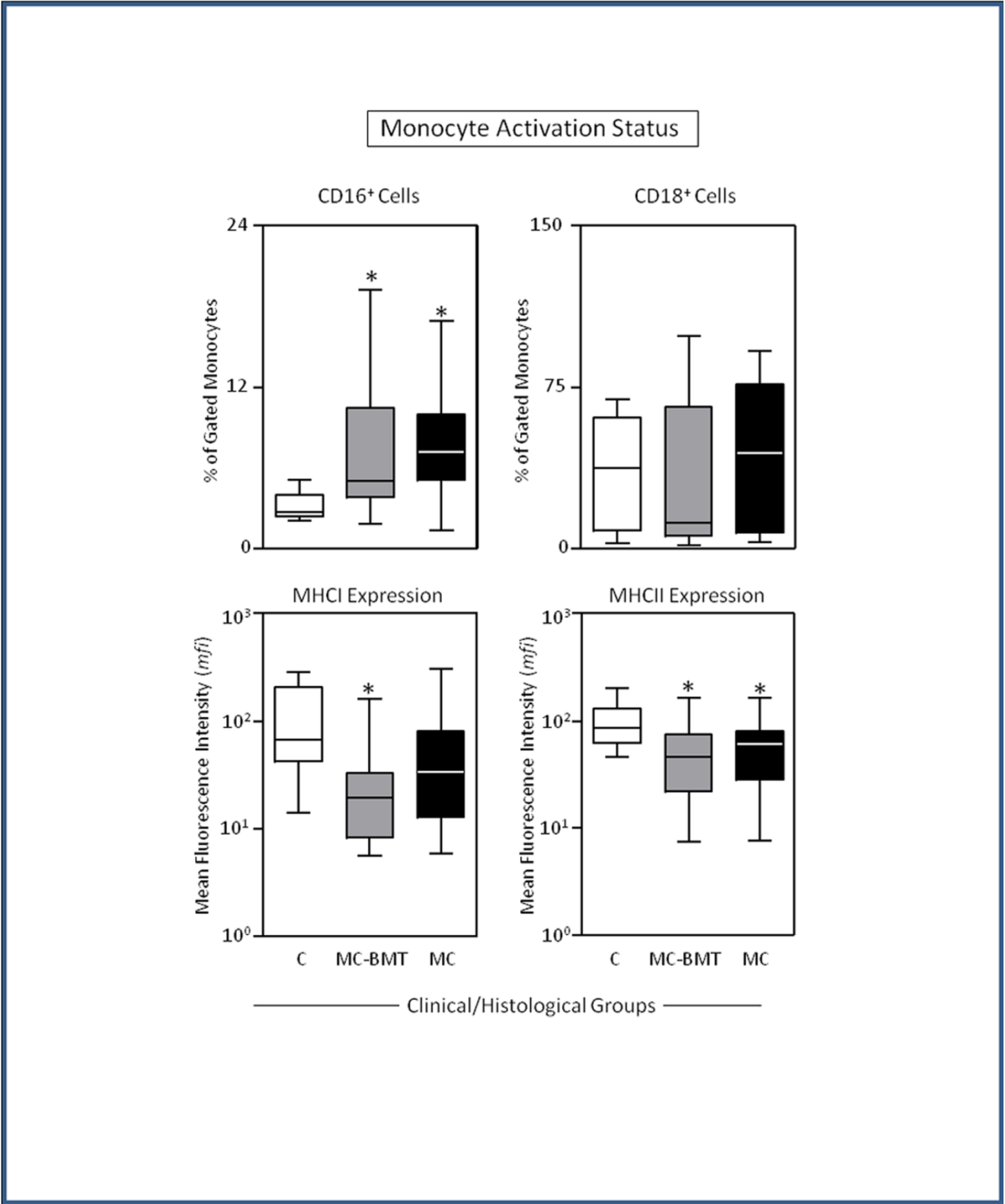


Fig.3

Fig. 3 MONOCYTES ACTIVATION STATUS in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas. Data analysis was carried out in healthy control female dogs (C=□) and female dogs with mammary carcinomas segregated into two clinical groups, according to the tumor histological classification: i) mammary carcinomas in benign mixed tumors (MC-BMT=□) and ii) mammary carcinomas (MC=■). Immunophenotypic analyses were carried out by single and dual color flow cytometry as described in Methods. Monocytes were first selected based on their morphometric (granularity - SSC) and immunophenotypic features (labeling with anti-CD14 TC mAbs) and identified as SSC^{Intermediate}CD14^{High} cells. Following, the activation status were determined by quadrant statistic on dual color FL3/TC *versus* FL1/FITC or FL3/TC *versus* FL2/R-PE dot plot distributions. The results are shown in box plot format showing the minimum, median and maximum values of CD16⁺ and CD18⁺ monocytes (expressed in percentage of gated monocytes), MHCI and MHCII expression (presented in mean fluorescence intensity - MFI). Significant differences at p<0.05 are indicated by asterisk for the comparison between the groups.

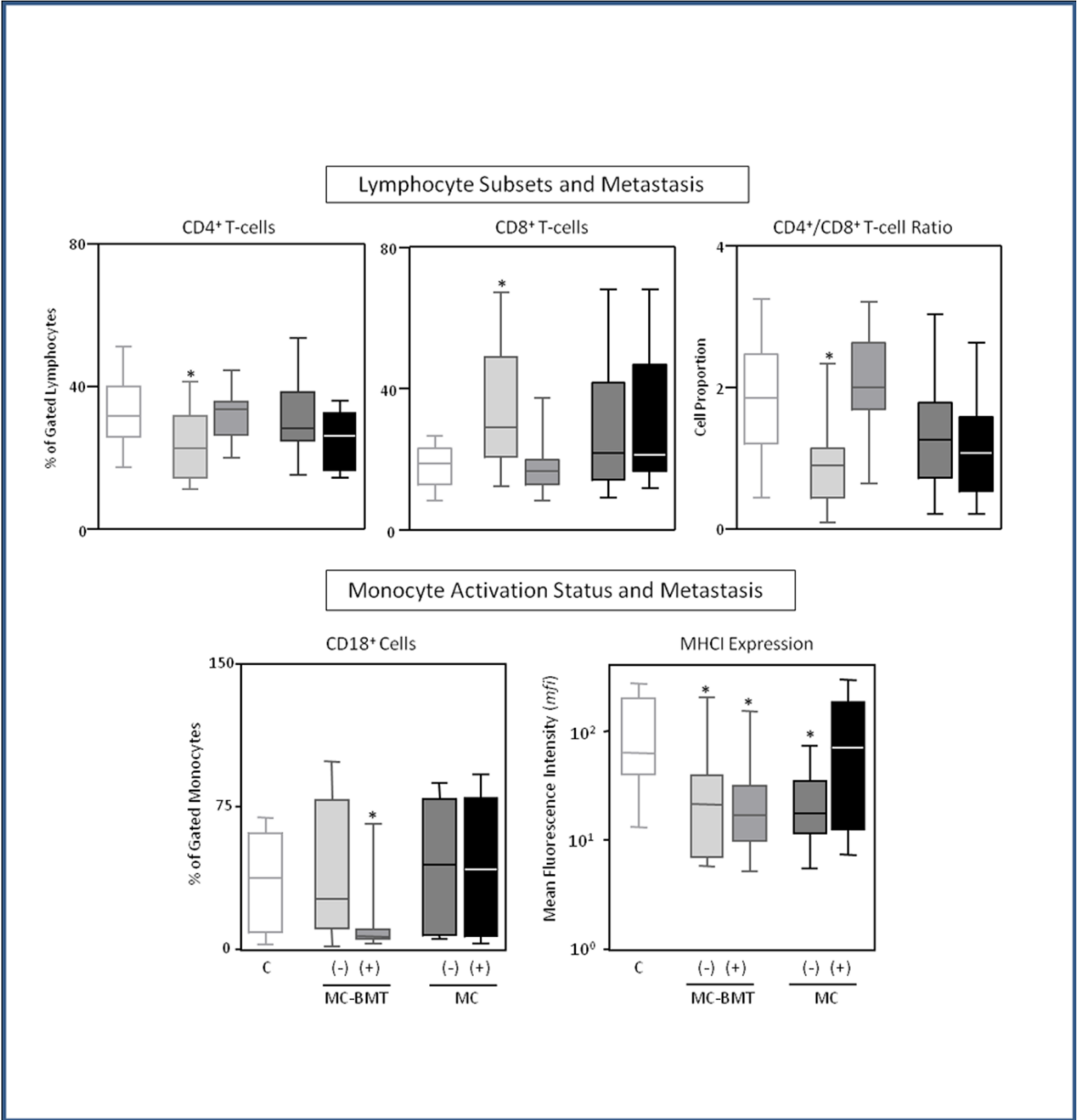


Fig.4

Fig. 4 LYMPHOCYTE SUBSETS and MONOCYTES ACTIVATION STATUS in peripheral blood of female dogs with mammary carcinomas. Data analysis was carried out in healthy control female dogs (C=□) and female dogs with mammary carcinomas segregated into four clinical groups, according to the tumor histological classification (mammary carcinomas in benign mixed tumors - MC-BMT or mammary carcinomas MC) followed by further subcategorization based on the absence (-) or presence (+) of lymph node metastasis and referred as: i) MC-BMT (-)=□, ii) MC-BMT (+)=■, iii) MC(-)=■ and iv) MC(+)=■. Immunophenotypic analyses were carried out by dual color flow cytometry as described in Methods. Total lymphocytes were first selected based on their Size (laser-forward scatter - FSC) and granularity (laser side scatter - SSC) and subsets analyzed by quadrant statistics on FL1/FITC *versus* FL2/R-PE dot plots. Monocytes were first selected based on their morphometric (granularity - SSC) and immunophenotypic features (labeling with anti-CD14 TC mAbs) and identified as SSC^{Intermediate}CD14^{High} cells. Following, the activation status were determined by quadrant statistic on dual color FL3/TC *versus* FL1/FITC or FL3/TC *versus* FL2/R-PE dot plot distributions. The results are shown in box plot format showing the minimum, median and maximum values of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, (expressed in percentage of gated lymphocytes), CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio (expressed in proportion), CD18⁺ monocytes (expressed in percentage of gated monocytes) and MHCII expression (presented in mean fluorescence intensity - MFI). The box stretches from the 25th percentile to the 75th percentile and the median is shown as a line across the box. Significant differences at p<0.05 are indicated by asterisk as compared to the control.

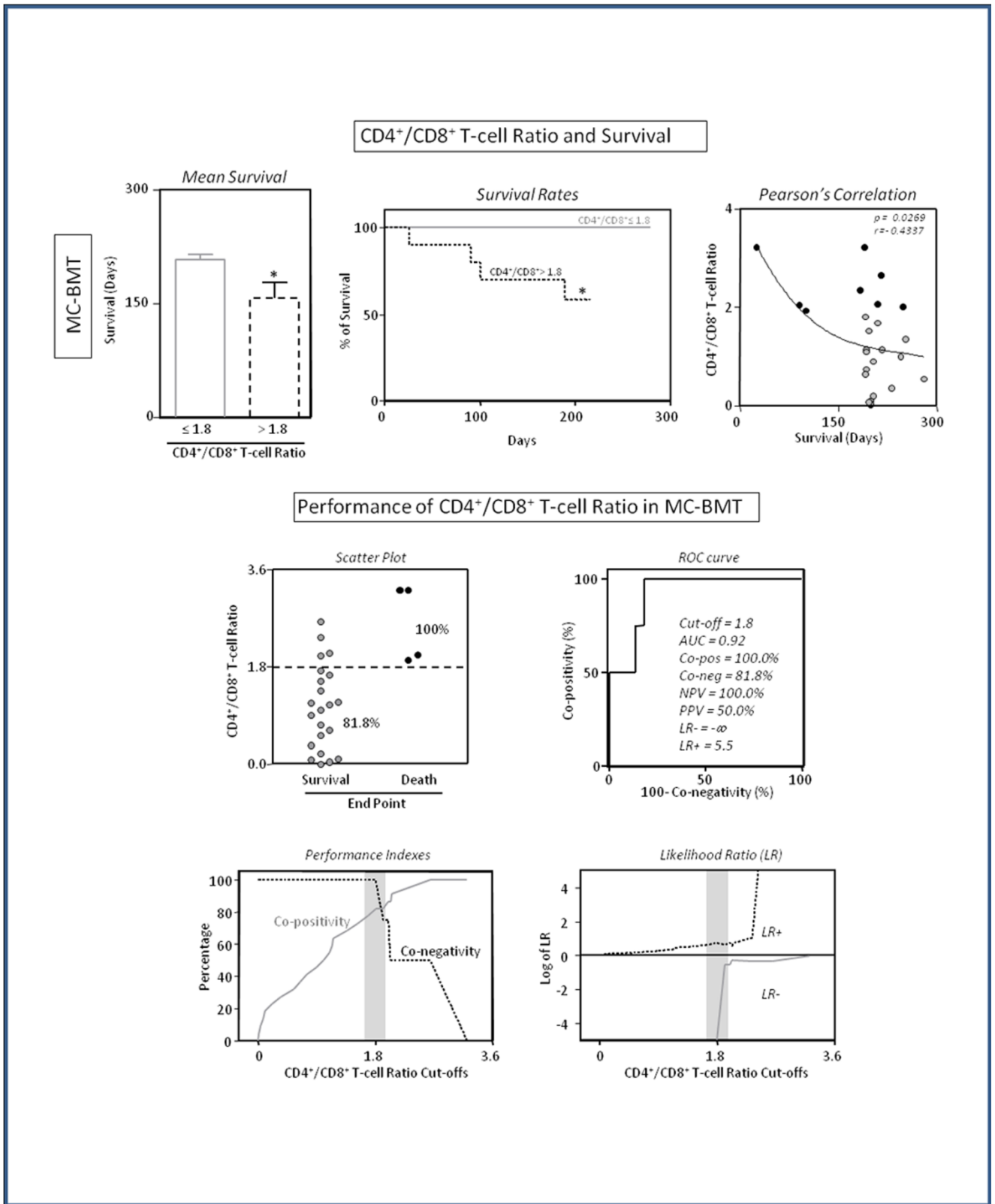


Fig.5

Fig. 5 CD4⁺/CD8⁺ T-CELL RATIO in peripheral blood and SURVIVAL of female dogs with mammary carcinomas in benign mixed tumors - MC-BMT. *Mean Survival*, presented as average \pm standard error and *Survival Rates*, presented in Kaplan-Meier curves, were compared between female dogs bearing MC-BMT segregated into two groups according to the levels of CD4⁺/CD8⁺ T-cell Ratio: i) ≤ 1.8 = □, — and ii) > 1.8 = ■, ---. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by asterisk. *Pearson's Correlation Analysis* was used to further confirm the association between the survival (●) or death (●) and the levels of peripheral blood CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio in female dogs bearing MC-BMT. Correlation indexes (r and p values) are provided in the figure. The value of CD4⁺/CD8⁺ T-cell Ratio to predict disease progression towards the survival or death in female dogs bearing MC-BMT was further evaluated using several performance indexes, including segregation in scatter plots, Receiver Operating Characteristic (ROC) curve indexes using a specific cut-off, including: Area Under the Curve/global accuracy (AUC), Co-positivity (Co-pos), Co-negativity (Co-neg), Negative and Positive Predictive Values (NPV and PPV) as well as negative and positive Likelihood Ratio (LR- and LR+). The performance indexes suggested that a CD4⁺/CD8⁺ T-cell Ratio < 1.8 is a useful biomarker to predict survival in female dogs bearing MC-BMT.

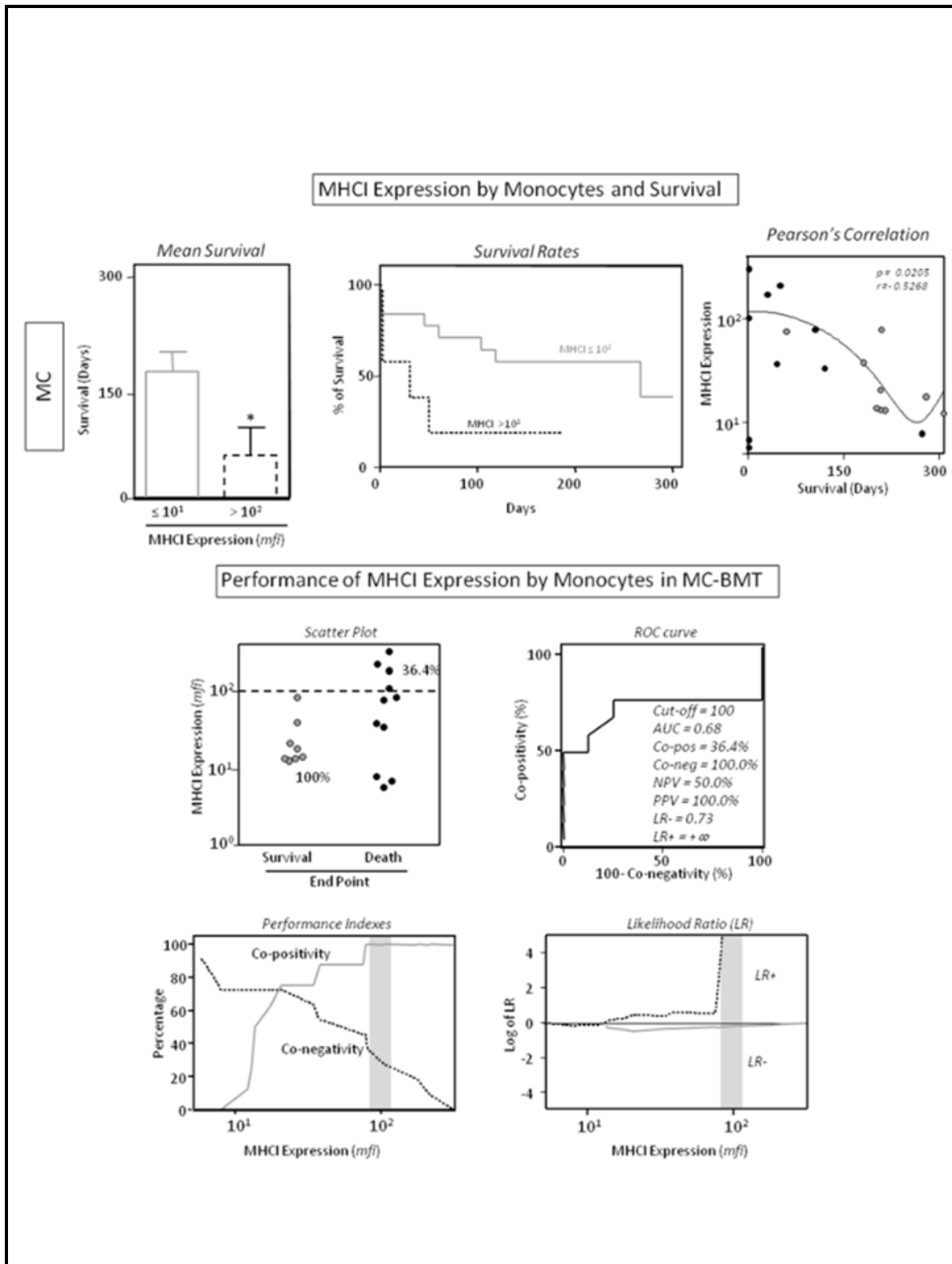


Fig.6

Fig. 6 MHC I EXPRESSION BY MONOCYTES in peripheral blood and SURVIVAL of female dogs with mammary carcinomas - MC. Mean Survival, presented as average \pm standard error and Survival Rates, presented in Kaplan-Meier curves, were compared between female dogs bearing MC segregated into two groups according to the mean fluorescence intensity of MHC I expression by monocytes : i) $\leq 100 = \square, _$ and ii) $> 100 = \square, _$. Significant differences at $p < 0.05$ are indicated by asterisk. Pearson's Correlation Analysis was used to further confirm the association between the survival (\odot) or death (\bullet) and the levels of MHC I expression by in peripheral blood monocytes in female dogs bearing MC. Correlation indexes (r and p values) are provided in the figure. The value MHC I expression by monocytes to predict disease progression towards the survival or death in female dogs bearing MC was further evaluated using several performance indexes, including segregation in scatter plots, Receiver Operating Characteristic (ROC) curve indexes using a specific cut-off, including: Area Under the Curve/global accuracy (AUC), Co-positivity (Co-pos), Co-negativity (Co-neg), Negative and Positive Predictive Values (NPV and PPV) as well as negative and positive Likelihood Ratio (LR- and LR+). The performance indexes suggested that MHC I expression by monocytes > 100 is a useful biomarker to predict death in female dogs bearing MC.

9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:

- A partir da análise morfométrica da resposta inflamatória associada aos carcinomas mamários de cadelas foi observado que o linfócito é o tipo celular predominante e sua intensidade influencia diretamente no estadiamento clínico, alterando, conseqüentemente no prognóstico do paciente;
- Além dos parâmetros clínico-patológicos clássicos, a distribuição e intensidade do infiltrado inflamatório linfocítico apresentou correlação inversa com a taxa de sobrevida, sendo proposto, por meio da análise multivariada, como fator prognóstico independente de sobrevida;
- A imunofenotipagem dos linfócitos infiltrantes revelou maior porcentagem de linfócitos T no grupo carcinoma em tumor misto (MC-BMT) sem metástase, sugerindo um efeito antitumoral destas células, enquanto os linfócitos B foram predominantes no grupo MC-BMT com metástase, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento tumoral. Contudo, estudos utilizando um número amostral maior se faz necessário para ratificar este resultado.
- Os linfócitos T $CD4^+$, neste estudo, estão associados à progressão tumoral, enquanto os linfócitos T $CD8^+$ inibem o desenvolvimento do tumor. Desta forma, a razão $CD4^+/CD8^+$ se apresenta como possível biomarcador para os estudos de acompanhamento de sobrevida, a exemplo do que já acontece na medicina.
- No grupo carcinoma em tumor misto (MC-BMT) resposta imune foi representada por significativa redução dos níveis de linfócitos B circulante e aumento da frequência de células NK. A resposta adaptativa, por sua vez, esteve associada com aumento da frequência de células $CD8^+$ e $CD8^+CD5^{Low+}$, denotando uma resposta antitumoral efetiva destas células;

- Os linfócitos avaliados no sangue periférico de cadelas portadoras de neoplasia mamária apresentam alto potencial de migração para o sítio tumoral, possivelmente objetivando a destruição das células transformadas. Entretanto, chama a atenção o reduzido *status* de ativação destas células (baixa expressão do MHC I e MHC II), caracterizando, possivelmente, um mecanismo de escape do tumor, tendo em vista que a expressão do MHC classe I pode ser sub-regulada pelas células tumorais;
- Os dois parâmetros imunofenotípicos propostos, razão $CD4^+/CD8^+$ para o grupo MC-BMT e IMF em monócitos para o grupo MC, possibilitaram a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência e morte, respectivamente. Estes dados conferem um significativo valor clínico contribuindo, atuando como biomarcadores prognósticos e de monitoração em cadelas com carcinomas mamários.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em cães, assim como nos humanos, o envolvimento do sistema imunológico tem um papel crucial no desenvolvimento de neoplasias, todavia, a participação da resposta inflamatória na promoção e desenvolvimento do câncer ainda é motivo de muita controvérsia, pois envolve a participação de mecanismos extremamente complexos e ainda pouco elucidados.

Neste estudo, foi avaliada pela primeira vez o infiltrado celular linfocitário associado aos carcinomas mamários de cadelas e sua relação com fatores prognósticos e taxa de sobrevida. Os resultados obtidos sinalizam a importante correlação entre infiltrado inflamatório e evolução tumoral, sendo interessante a introdução da análise do infiltrado inflamatório associado ao tumor, quanto à distribuição e principalmente a graduação da intensidade, como parâmetro complementar nos laudos histopatológicos em medicina veterinária.

Estudos no campo da imunologia tumoral demonstram que a ativação de linfócitos T CD4⁺ auxiliares e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos em proporções adequadas conduzem a uma eficiente resposta imune que resulta na destruição das células tumorais. No entanto, neste estudo, observou-se que os linfócitos T CD4⁺ estavam associados ao aumento da malignidade e metástase, enquanto os linfócitos T CD8⁺ apresentavam correlação com maior taxa de sobrevida. Não seria a maioria destas células CD4⁺ constituídas por células T reguladoras? Sabidamente estas células podem alterar a resposta anti-tumoral a partir da inibição da ação dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, células NK e células dendríticas, além de secretar citocinas imunossupressoras que induzem uma resposta do tipo Th2. Nesse contexto, novas propostas de estudo devem ser direcionadas para a determinação do percentual de células T reguladoras no sangue periférico, no microambiente tumoral e linfonodos regionais, sua ação no desenvolvimento ou inibição tumoral, bem como a avaliação do perfil de citocinas secretadas por estas células.

Embora a citometria de fluxo ainda seja um procedimento considerado oneroso para a maioria dos proprietários, seu valor é indiscutível na rotina oncológica de pequenos animais, pois a realização da imunofenotipagem dos leucócitos, circulantes e infiltrados no tumor, possibilita uma abordagem terapêutica mais rápida e individualizada, proporcionando aos pacientes uma maior qualidade e tempo de sobrevida, além de redução no número de óbitos relacionados à neoplasia. Além disto, os biomarcadores laboratoriais propostos representam uma ferramenta alternativa útil no acompanhamento da evolução clínica e sobrevida do

paciente, influenciando no prognóstico, participando também no estabelecimento de possíveis protocolos terapêuticos baseados no perfil imunofenotípico desses tumores.

Desta forma, o conhecimento de como o processo inflamatório crônico está envolvido com o câncer cria perspectivas para o desenvolvimento e utilização de estratégias terapêuticas específicas. A adoção da transferência de células T em animais com câncer tem mostrado resultados efetivos na erradicação de muitos tumores. Na espécie humana, ensaios clínicos utilizando infusão de células T tumor-específicas, derivadas dos linfócitos infiltrantes no tumor ou dos linfonodos regionais apresentaram resultados animadores, mesmo que, ainda limitados a determinados tipos tumorais.

Adicionalmente, os resultados observados geram perspectivas para a caracterização da resposta inflamatória no carcinoma inflamatório de mama, um tumor de comportamento extremamente agressivo, sem tratamento efetivo conhecido até a presente data e de prognóstico desfavorável, que acomete cadelas, gatas e mulheres levando esses pacientes à morte dentro de um curto período.

Diante dos resultados observados neste estudo e as inúmeras indagações aventadas, pretende-se instituir uma nova linha de pesquisa direcionada a avaliação dos vários aspectos da resposta inflamatória associada às neoplasias mamárias em cadelas amparada pela parceria existente entre as Instituições envolvidas (Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal da Bahia e o Centro de Pesquisas René Rachou PqRR/ Fiocruz Minas Gerais).

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTOMAA, S.; LIPPONEN, P.; ESKELINEN, M.; et al: Lymphocytes infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *European Journal Cancer*, v. 28, p. 59-864, 1992.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Imunidade contra tumores. In: *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 401-420.

ALLRED, D.C.; HARVEY, J.M.; BERARDO, M.; et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology*, v.11, p. 155-168, 1998.

ANDRADE, F.H.E, FIGUEIRO, A.F.C.; BERSANO, P.R.O; et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic pathology*. **v.45, p.1-5, 2010**

ARAUJO, M.S.S.; ANDRADE, R.A.; VIANNA, L.R.; et al. Despite Leisvaccine and Leismune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potential against canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 26, p. 2211-2224, 2008.

ASPORD, C.; PEDROZA-GONZALEZ, A.; GALLEGOS, M.; et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *The Rockefeller University Press*, v. 204, p. 1037 – 1047, 2007.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Research*, v. 31, p. 31-36, 2003.

BERTAGNOLLI, A.C.; CASSALI, G.D.; GENELHU, M.C.L.S.; et al. Immunohistochemical expression of p63 and {Delta}Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology*, v.46, p. 407-415, 2009.

BLANKENSTEIN, T. The Role of inflammation in tumour growth and tumour suppression. *Cancer and inflammation*. In: Novartis Foundation Symposium, p. 205 – 214, 2004.

BOSTOCK, D.E. Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal*, v142, p.506-515, 1986.

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

CAMP, B.J.; DYHRMAN S.T.; MEMOLI, V.A.; et al. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Annals Surgical Oncology*, v.3, p.176-184, 1996.

CAMPBELL, M.J.; SCOTT, J.; MAECKER, H.T.; et al. Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 91, p.163–171, 2005.

CARNEIRO, C.R.W.; PRADO, I.B.; Imunologia dos tumores. In: BRENTANI, M.M. et al. Bases da oncologia. Sao Paulo: Lemar, 1998. p. 99-124.

CASSALI, G.D.; FERREIRA E.; ESTRELA-LIMA, A.; et al., Genética aplicada ao câncer de mama. *Prática Hospitalar*, v. 57, p. 15-17, 2008.

CASSALI, G.D.; GOBBI H.; MALM, C.; et al. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, v.18, p. 191-6, 2007.

CASSALI, G.D.; SERAKIDES, R.; GARTNER, F.; et al., Invasive micropapillary carcinoma. A case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, p. 366-369, 2002.

CASSALI, G.D. Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com as neoplasias da mama humana. 2000, 72p. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

CATCHPOLE, B.; GOULD, S.M.; KELLETT-GREGORY, L.M.; et al. Immunosuppressive cytokines in the regional lymph node of a dog suffering from oral malignant melanoma. *Journal Small Animal Practice*, v. 43, p. 464–467, 2002.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. *Revista Clínica Veterinária*, v.61, p. 56-63, 2006.

CAVALCANTI, M.F. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: Estadiamento TNM e Sistema de Nottingham, 2006, 105f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editors. *Diseases of breast*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.461-470

CLARK JR, W.H.; ELDER, D.E.; GUERRY, D.T.; et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*. v. 81(24):1893-1904, 1989.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *Journal Experimental Medicine*, 193(6):23-26, 2001.

DALECK, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C.; et al. Aspectos clínico e cirúrgico do tumor mamário canino. *Ciência Rural*, v.28, p.95-100, 1998.

DAMASCENO, K.A. Caracterização morfológica e morfométrica da resposta inflamatória nos carcinomas mamários em cadelas. 2008. 67f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária)- Universidade Federal da Bahia, Salvador.

DE MATOS, A.J.; LOPES, C.C.C.; FAUSTINO, A.M.R.; et al. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Research*, v 3A, p.1821-1826, 2006.

DE NARDI, A. Correlação da ciclooxigenase-2 com ki-67, p53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

DE VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSEN, L. Paradoxical roles of the immune during cancer development. *Nature Reviews*, v. 6, p. 24-40, 2006.

DENARDO, D.G., COUSSENS, L.M. Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, v.9, p. 1-10, 2007

DENG, C., BRODIE, S.G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. *Cancer Biology*, v. 11, p. 387-394, 2001.

DENKERT, C.; LOIBL, S.; NOSKE, A.; et al. Tumor associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, p. 105-113, 2010.

DISIS, M.L.; PARK, K.H. Immunomodulation of breast cancer via tumor antigen specific Th1. *Cancer Treatment and Research*, v.43, p.117-121, 2009

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, v.40, p.207-212, 2003.

DUNN, G.P.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*, v.22, p.329-60, 2004.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, v.3, p.991-998, 2002.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological grade. In: *Systemic Pathology. The breast*. 3. ed. Eds CW. Elston, IO. Ellis. London: Churchill Livingstone. p. 365-384. 1998

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Method for grading breast cancer. *Journal Clinical Pathology*, v.46, p. 189-190, 1993.

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

FERGUSON, H.R. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.3, p. 501-511, 1985.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*. v. 7, p.1-6, 2009.

FERREIRA, E.; BREGUNCI, G.C.; SCHMITT, F.C.; et al. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, v. 55, p. 105-109, 2003.

FERREIRA, K.A.S.L. Dor e qualidade de vida relacionada a saúde de pacientes com câncer: influência das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β . 2008. 253f. Tese. Escola de Enfermagem – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FITZGIBBONS, P.L.; PAGE, D.L.; WEAVER, D.; et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement, 1999. *Archives Pathology & Laboratory Medicine*, v. 124, p. 966-978, 2000.

FLAVELL, R.A.; SANJABI, S.; WRZESINSKI, S.H.; et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nature Reviews Immunology*. V.10, p.554-567, 2010.

FORMAN, J.T. Cells, the MHC, and function. *Immunology*, v. 81, p. 203-219, 1984.

GENELHU, M.C.; CARDOSO, S.V.; GOBBI, H.; et al. A comparative study between mixed-type tumors from human salivary and canine mammary glands. *BMC Cancer*, v7, 218, 2007.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F.N. A immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *The Veterinary Record*, v.146, p. 403-406, 2000.

GIERCKSKY, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. v.15, p.821-833, 2001.

GILBERTSON, S.R.; KURZMAN, I.D.; ZACHRAU, R.E.; et al. Canine mammary epithelial neoplasms: biological implications of morphological characteristics assessed in 232 dogs. *Veterinary Pathology* v. 20, p. 127-142, 1983.

GRUDZINSKI, M.; CAMBRUZZI, E.; LAHUDE, E.; et al. Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 52, p. 275-280, 2006.

HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. *Veterinary Pathology*, v. 42, p. 776-780, 2005.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v.21, p. 427-433, 2000.

HUANG, Y.C.; HUNG, S.W.; JAN, T.R.; et al. CD5-low expression lymphocytes in canine peripheral blood show characteristics of natural killer cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 84: 1501-1510, 2008.

HUNG, K.; HAYASHI, R.; LAFOND-WALKER, A.; et al. The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 188, p. 2357-2368, 1988.

HUTTNER, R.K.G.; BREUER, S.K.; PAUL, P.; et al. Generation of potent anti-tumor immunity in mice by interleukin-12-secreting dendritic cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 54, p. 67-77, 2005.

ICHIHARA, F.; KONO K, TAKAHASHI A, et al. Increased Populations of Regulatory T Cells in peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Gastric and Esophageal Cancers. *Clinical Cancer Research*, v. 9: p. 4404–4408, 2003.

INGVARSON S. Breast cancer: introduction. *Cancer Biology*, v.11, p.323-326, 2001.

KELLY LM, HILL ADK, CONNOLLY EM, et al. Lack of prognostic effect of COX-2 expression in primary breast cancer on short-term follow-up. *European Journal of Surgical Oncology*. v. 29, p.707-710, 2003.

KIM, J.H.; YU, C.H.; YHEE, J.Y.; et al. Lymphocyte Infiltration, Expression of Interleukin (IL) -1, IL-6 and Expression of Mutated Breast Cancer Susceptibility Gene-1 Correlate with Malignancy of Canine Mammary Tumours. *The Journal of Comparative Pathology*. v. 142, p. 177-186, 2010.

KNOWLES, H.; LEEK, R.; HARRIS, A. Macrophages infiltration and angiogenesis in human malignancy. Cancer and inflammation. *Novartis Foundation Symposium*, p. 189-204, 2004.

KODAMA, M.; KODAMA, T. Statistical analysis of hormonal effects on the steroid responsiveness of solid Ehrlich tumors. *Cancer Research*, 30:228-235, 1970.

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, p. 218-224, 2006.

KURZMAN, I.D.; GILBERTSON, S.R. Prognostic factors in canine mammary tumors. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v. 1, p.25-32, 1986.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow, SJ; Macewen, EG. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 619-636.

LAUFER-AMORIM, R.; SOUZA, C.H.M.; BANDARRA, E.P.; et al. 1359 Immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors and cell proliferative index 1360 in canine inflammatory mammary carcinoma: 9 cases. *Brazilian Journal Veterinary Pathology*, v. 1, 16-20, 2008.

LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.T.; et al. COX-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary Pathology*, 46: p.1-6, 2009.

LEONG, P.P.; MOHAMMAD, R.; IBRAHIM, N.; et al. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in Infiltrating Ductal Carcinoma Of The Breast. *Immunology Letters*, v. 102, p. 229-236, 2006.

LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Minireview Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *British Journal of Cancer*, v. 90, p. 2053 – 2058, 2004.

LIN, W.W.; KARIN, M.A. Cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. v.117, p.1175- 1183, 2007.

LIN, Y.C. ; HUANG, Y.C. ; WANG, Y.S. ; et al. Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.133, p. 144-53, 2010.

LIYANAGE, U.K.; MOORE, T.T. ; JOO, H.G.; et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal Immunology*, v. 169, p. 2756–2761, 2002.

LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw Hill; 1968.

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

MACEWEN, E.G.; PATNAIK, A.K.; HARVEY, H.J.; et al. Entrogen receptors in canine mammary tumours. *Cancer Research*. v. 42, p. 2255-2259, 1982.

MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D. Immunology 7th., St. Louis Mosby, 2006, 564p.

MALMBERG, K. Effective immunotherapy against cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 53, p. 879-892, 2004.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. *Nature*. v. 454, p. 436–44, 2008.

MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: the macrophage connection. *Medicina(Buenos Aires)*, v. 67, p. 32-34, 2007.

MARINHO, V.F.Z. ; METZ, K.; SHANCHES, F.S.F; et al. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 53, p.203-207, 2008.

MARTIN, P.M.; COTARD, M.; MIALOT, J.P.; et al. Animal models for 1385 hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profiles

in 1386 canine and feline mammary tumors and survival rate. *Cancer Chemotherapy. Pharmacology*, 1984, 12, 1387-1397.

MARTINS, D.C.; PLIEGO, C.M.; FERREIRA, M.L.G.; et al. Utilização de 1390 marcadores prognósticos no estudo da proliferação celular em adenocarcinomas mamários. *1391 Ciência. Animal. Brasileira. (UFG)*, v.9, 125-127, 2008.

MARX, J. Inflammation and cancer: The link grows stronger. *Science*, v.306, p.966-968, 2004.

MATKOWSKI, R.; GISTEREK, I.; HALON, A.; et al. The Prognostic Role of Tumor-infiltrating CD4 and CD8 T Lymphocytes in Breast Cancer. *Anticancer Research* v. 29, p. 2445-2452, 2009

MIESCHER, S.; WHITESIDE, T. L.; CARREL S.; et al. Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *Journal Immunology*, v. 136: 1899–1907, 1986.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; et al. 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, p. 115-120, 2006.

MISDORP, W.; ELSE, W.; HELLM'EN, E.; et al. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In *Second Series. WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals Volume 2*. Washington, DC, AFIP; 1999: p. 59.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In *Tumors in Domestic Animals* 4th edition. Edited by: Meuten DJ. Iowa State: University of California; 2002. p. 575-606.

MITCHELL, L.; LA LGLESIA, F.A.; WENKOFF, M.S.; et al. Mammary tumors in dogs: survey of clinical and pathological characteristics. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 15, p. 131-138, 1974.

MORETTA, L.; BOTTINO, C.; PENDE, D.; et al. A Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *European Journal of Immunology*, v. 32, p. 1205-11, 2002.

MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; et al. Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. *The Veterinary Record*, v. 142, p. 656-658, 1998.

MURRI, A.M.A.I.; HILMY, M.; BELL, J.; et al. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *British Journal Cancer*, v. 99, p. 1013-19, 2008.

MURTA, E.F.C.; ANDRADE, J.M.; FALCÃO, R.P.; et al. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori*, v. 86, p. 403-407, 2000.

NAKAO, S.; KUWANO, T.; TSUTSUMI-MIYAHARA, C.; et al. Infiltration of the COX-2 – expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 β – induced neovascularization and tumor growth. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 2979-2991, 2005.

NICOLINI, A.; CARPI, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* v.17, p.325–337, 2006

NIZAR, S.; COPIER, J.; MEYER, B.; et al. T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *British Journal of Cancer*, v.100, p. 1697-1703, 2009.

NOGUEIRA, C.R.; BRETANI, M.M. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.59, p.271-279, 1996.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 8, p. 107-109, 2003.

NOWAK, M.; MADEJ, J.P.; ROSSOWSKA, J.; et al. Involvement of CD8+ cells in protective mechanisms in canine mammary adenocarcinomas (short communication). *Bull Veterinary Institute Pulawy*, v. 51, p. 445-448, 2007.

ONO, M. Review Article Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Science*, v.99, p. 1501–1506, 2008.

ORR, M.T.; LANIER, L.L. Natural killer cell education and tolerance. *Cell*, v.142:847-856, 2009.

OWEN, L.N. TNM Classification of tumors in Domestic Animals. *World Health Organization*, Geneva; 1980:26-32.

PAG, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M.C.; et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, v. 29, p. 1093-1102, 2010.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature*, v. 8, p. 147-156, 2008.

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

PEÑA, L.L.; NIETO, I.; PEREZ-ALENZA, D.; et al. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 10, p. 237-246, 1998.

PEREIRA, P.D.; LOPES, C.C.; MATOS, A.J.F.; et al. Estrogens metabolism associates with polymorphism: influence of MOMT G482a genotype on age at onset of canine mammary tumours. *Veterinary Pathology*, v. 45, p. 124-125, 2008.

PEREZ-ALENZA, M.D.; PEÑA, L.; DEL CASTILLO, N.; et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, v.41, p.287-291, 2000.

PEREZ-ALENZA, M.D.; RUTTEMAN, G.R.; PEÑA, L.; et al. Relation between habitual diet and canine mammary tumors in case-control study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 12, p. 132-139, 1998.

PHILIBERT, J.C. ; SNYDER, P.W. ; GLICKMAN, N. ; et al. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal Veterinary Internal Medicine*, v. 17, p. 102-106, 2003.

POLLARD, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. v. 4, p.71-8, 2004.

PRIER, J.E.; BRODEY, R.S. Canine Neoplasia: A Prototype for Human Cancer Study. *Bulletin. Wid Hith Org*. v. 963, p.331-344, 1963

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.57, p. 119-127, 2002.

RANGEL, M.M.M.; FERNANDES, N.C.C.A.; NAGAMINE, M.K.; et al. Eletroquimioterapia: uma nova promessa para o tratamento de cânceres em animais. *Clínica Veterinária*. v.75, p. 30-36, 2008.

REED, W.; HANNISDAL, E.; BOEHLER, P.J.; et al. The prognostic value of p53 and C-erb B-2immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognosticfactors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer* , v. 88, p. 804-13, 2000.

RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.; COSTA NETO, J.M.; et al. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. *Veterinária em Foco*, v.6, p.134-139, 2009.

RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.; et al. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Animal Health Research Reviews*, v. 5, n. 2, p. 227-234, 2004.

ROSENBERG, S.A.; YANG, J.G.; RESTIFO, N.P. Cancer Immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Med*. v. 10, p. 909-915, 2004.

RUBBERT, A.; MANGER, B.; LANG, N; Functional characterization of tumor-infiltrating lymphocytes, lymph node lymphocytes and peripheral-blood lymphocytes from patients with breast cancer. *International Journal Cancer* v.49, p. 25-31, 1991

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G.; Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Small animal clinical oncology. 2th ed. Philadelphia: Sanders, 2001. p.455-477.

RUTTERMAN, G.R.; MISDORP, W. Hormonal background of canine and feline mammary tumors. *Journal Reproduction and Fertility Suppl*, v.47, p.483-487, 1993.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

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.

SHEU, B.C.; HSU, S.M.; HO, H.N.; et al. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *American Cancer Society*, v. 86, p.1537-1543, 1999.

SHEU, B.C.; KUO, W.H.; CHEN, R.J.; et al. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. *The Breast*, v. 17, p. 604-610, 2008.

SICA, A.; ALLAVANA, P.; MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Letters*, v.264, p. 204–215, 2008

SILVA, A.E.; FERREIRA, E.; MORAES, J.R.C.; et al. Effect of hypothyroidism on growth, viability, and characteristics of ascitic ehrlich tumor cells in ovariectomized and non- ovariectomized mice. *Journal of Applied Animal Research*, v.7, p. 158-166, 2007.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Revista Ciência Rural*, v. 34, p. 625-633, 2004.

SNYDER, P.W. Doenças da Imunidade. In: McGavin MD, Yacharz, JF. Bases da Patologia Veterinária. 4 ed. Mosby Elsevier: Sao Paulo, 2009, p.193–298

SORENMO, K.; SHOFER, F.; GOLDSCHMIDT, M. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, p. 266-270, 2000.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 33, p. 573-596, 2003.

STEWART, T.H.M.; HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology*, v. 115, p. 141-153, 1997.

TAKAHASHI, A.; KONO, K.; AMEMIYA, H.; et al. Elevated caspase-3 activity in peripheral blood T cells coexists with increased degree of T-cell apoptosis and down-regulation of TCR _ molecules in patients with gastric cancer. *clinical cancer research*, v. 7, p. 74–80, 2001.

TAVARES, W.L.F.; FIGUEIREDO, M.S.; SOUZA, A.G.; et al. Evaluation of dose and side effects of tamoxifen in female 1525 dogs. V ONCOVET, 2009, São Paulo. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, p.93-94, 2009

TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; ANDRADE, Z.A.; et al. The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human Schistosomiasis mansoni infection. *Scandinavian Journal Immunology*, v.56, p. 315-322, 2002.

TERZIAN, A.C.B.; ZUCCARI, D.A.P.C.; PEREIRA, R.S.; et al. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Brazilian Journal Veterinary Animal science*, v. 44, p.96-102, 2007.

THUN, M.J.; HENLEY, S.J.; GANSLER, T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found Symposium*, v. 256, p. 6-21, 2004.

TODOROVA, I.; SIMEONOVA, G.; SIMEONOV, R.; et al. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in dogs with spontaneous mammary tumours. *Trakia Journal of Sciences*, v. 3, p.51-58, 2005

TOMINAGA, M.; HORIUCHI, Y.; ICHIKAWA, M.; et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 22, p.438–441, 2010.

TORÍBIO, J.M.M.L. Caracterização clínica, classificação histopatológica e georreferenciamento das neoplasias mamárias em cadelas no município de Salvador. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos)-Universidade Federal da Bahia, Salvador.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D.A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.54, p. 63-77, 2008.

UVA, P. AURISICCHIO L, WATTERS J, et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, v. 135, p. 1-20, 2009.

VAN DIEST, J.P.; BAAK, J.P.A.; MATZE-COK, P.; et al. Reproducibility of mitosis counting in 2469 breast cancer specimens: Results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project. *Human Pathology*, v.23, p. 603-607, 1992.

VORHERR, H. Endocrinology of breast cancer. *Maturitas*, v. 9, p. 113-122, 1987.

WERNER, P.R.; WERNER, J. Avaliação histopatológica. In: DALECK, CR et al (Ed.). *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2009, 121-34.

WESTERMANN, J.; PABST, R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today*, v.11, p. 406-410, 1990.

WHITESIDE, T.L.; HERBERMAN, R.B. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current Opinion in Immunology*, v. 7, p.704–10, 1995.

WHITESIDE, T.L. MIESCHER, S.; HURLIMANN, J.; et al. Clonal analysis and in situ characterization of lymphocytes infiltration human breast carcinomas. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v.23, p. 169-178, 1986.

WHITESIDE, T.L. The local tumor microenvironment. In *General Principles of Tumor Immunotherapy: Basic and Clinical Applications of Tumor Immunology* Edited by: Kaufmann H, Wolchok JD. Springer; :145-167, 2007.

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

WHITFORD, P.; MALLON, E.A.; GEORGE, WD. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer. *British Journal of Cancer*, v.62, p. 971-975, 1990

WILLIAN, C.S.; MANN, M.; DUBOIS, R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene*, v.18, p.7906-7916, 1999

WINNICKA, A.; JAGIELSKI, D.; HOFFMANN-JAGIELSKA, M.; et al. Cytometric Evaluation of Peripheral Blood Lymphocytes in Dogs with Lymphoma during Chemotherapy. *Journal Veterinary Medicine Association* v. 49 p. 303–306, 2002

WITHROW, S.J.; MACEWEEN, E.G.; Tumors of the mammary gland. In *Small Animal Clinical Oncology* 3rd edition. Edited by: Withrow SJ, Mac Eween EG. W. B. Saunders Company, Philadelphia; 2001. p 455-77.

YAMAGAMI, T.; KOBAYASHI, T., TAKAHASHI, K.; et al. Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 58, p. 1079–1083, 1996.

YAQUB, S.; AANDAH, E.M. Inflammation Versus Adaptive Immunity in Cancer Pathogenesis. *Oncogenesis*, v.15, p. 43–63, 2009.

YOO, S.Y.; LEE, S.Y.; YOO, N.C. Cytokine expression and cancer detection. *Medical science monitor*, v.15, p.49-56, 2009.

YU, J.L.; RAK, J.W. Review Host microenvironment in breast cancer development:Inflammatory and immune cells in tumour angiogenesis and arteriogenesis. *Breast Cancer Research*, v.5, p. 83-88, 2003.

ZISMAN, A.; PANTUCK, A.J.; BELLDEGRUN, A. Immune and genetic therapies for advanced renal cell carcinoma. *Reviews in Urology*. v.2, p. 54-60, 2000.

ZUCARRI, D.A.P.C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; et al. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias–importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arquivos de Ciências da Saúde*. out/dez; v.15, p189-98, 2008

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; CURY, P.M.; et al. .Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker incanine mammary neoplasia. *Veterinary Clinical Pathology*, v.33, p.23-8, 2004

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

12. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para exame anatomopatológico de tumores mamários caninos-modificado de Ferreira, et al. (2003).

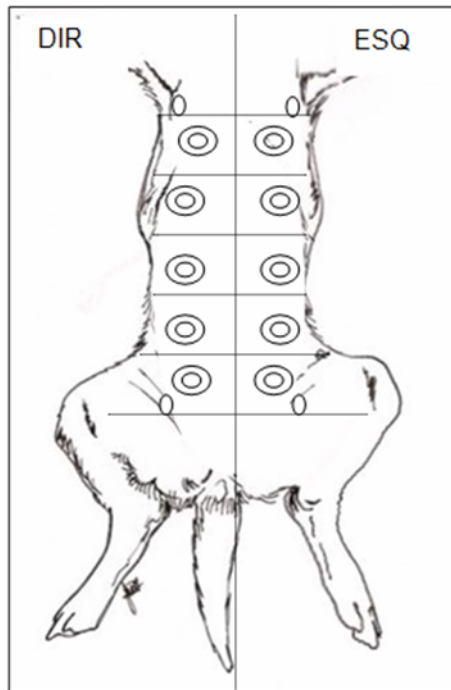
**FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS
MAMÁRIAS**

RG: _____ RG projeto: _____ Data: _____
Histo: _____ Cito: _____ Raio-X: _____
Proprietário: _____ Telefone: _____
Endereço: _____
Nome: _____ Espécie: _____ Raça: _____
Sexo: Macho Fêmea Pelagem: _____ Cor: _____
Idade: _____ Porte: Pequeno (até 35cm) Peso: _____
FC: _____ FR: _____ Médio (36-46cm) Condição corporal: Magro
Mucosas: _____ TPC: _____ Grande (acima 46cm) Normal
Alimentação: Ração Comida caseira Ração + Comida caseira Obeso
Ambiente: _____
Antecedentes genéticos: _____
Vacinação: Anti-rábica Sim Não Quando/Qual: _____
Outras Sim Não Quando/Qual: _____
Vermifugação: Sim Não Quando/Qual: _____
Doenças anteriores e atuais: _____

Tomando medicamento: Sim Não Qual/Tempo: _____
Anticoncepcional: Sim Não Quanto/Qual: _____ Última data: _____
Cio Regular: Sim Não Último (data): _____
Castrada: Sim Não Idade: _____
Pseudo-gestação: Regulares Intermitentes Não
Partos: Sim Não Quantos: _____ Último: _____
Aborto: Sim Não Quantos: _____ Último: _____
Já cruzou e não emprenhou: Sim Não
Secreção vaginal: Sim Não Quando/Intensidade: _____
Características do(s) tumor(s):
 Integra Ulcerada Cística

Mamas acometidas: (Esquema)

Exames solicitados:.....



Marcar com um X o tamanho correspondente:

M1D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M1E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M2D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M2E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M3D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M3E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M4D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M4E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M5D - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

M5E - <= 3cm ; >3-5cm ; >5cm

Outro local:

Consistência:

Secreção: Sim Não

Edema de membros: Sim Qual(is)? Não

Linfonodos infartados: Sim Qual(is)? Não

Veterinário resp: Data:/...../.....

Anexo 2: Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (modificado de Owen, 1980).

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a : não fixo b : fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a : não fixo b : fixo
T3 Tumor > 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao músculo	Metástases à Distância (M)
T4 Tumor de qualquer tamanho	M0 Sem evidência de metástase distante

Agrupamento por estádios

Estadiamento	T	N	M
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
Estádio IV	T1; T2; T3	N1	M0
Estádio V	T1; T2; T3	N0; N1	M1

T- Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase
(*FONTE: Cavalcanti e Cassali, 2006, modificado de Owen, 1980*)

Anexo 3: Tabela 1 - Pannel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular

Anticorpos* Monoclonais	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Diluição final	Células alvo
Anti-CD3 canino	Camundongo	CA17.2A12	R-PE	1:10	Linfócitos T maduros
Anti-CD4 canino	Rato	YKIX302.9	PE	1:320	Linfócitos T auxiliar e neutrófilos
Anti-CD4 canino	Rato	YKIX302.9	FITC	1:320	Linfócitos T auxiliar e neutrófilos
Anti-CD5 canino	Rato	YKIX322.3	FITC	1:160	Linfócitos T
Anti-CD8 canino	Rato	YCATE55.9	FITC	1:40	Céls. T supressoras e/ou citotóxicas
Anti-CD8 canino	Rato	YCATE55.9	PE	1:80	Céls. T supressoras e/ou citotóxicas
Anti-CD14 humano	Camundongo	TuK4	R-PE-Cy5	1:40	Monócitos e granulócitos
Anti-CD18 humano	Rato	YFC118.3	R-PE	1:6	Leucócitos
Anti-célula B canino	Camundongo	CA2.1D6	R-PE	1:160	Linfócitos B
Anti-MHC II canino	Rato	YKIX334.2	FITC	1:80	Células mononucleadas
Anti-MHCI camundongo	Camundongo	2G5	R-PE	1:20	Células nucleadas

* Todos os anticorpos monoclonais foram produzidos pela **SEROTEC Ltd** (Oxford - England).

Anexo 4: Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 191/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Expressão da *cox-2* e caracterização da resposta inflamatória nos carcinomas de mama de cadelas**", que tem como responsável **Geovanni Dantas Cassali**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 02/2007**.

Este certificado expira-se em **28/ 02 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 191/2006**, related to the project entitled "***Cox-2* expression and inflammatory response in canine mammary carcinomas**", under the supervision of **Geovanni Dantas Cassali**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **February 28, 2007**.

This certificate expires in **February 28, 2012**.

Belo Horizonte, 28 de Fevereiro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2065
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod. Curt. v1.0)

Anexo 5: Comprovante de Aceite do artigo 2 à revista

Breast Cancer Research and Treatment Editorial Manager

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: oamfilho

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Olindo Assis Martins-Filho

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set
Action Links	BREA6494	Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers	Jan 18, 2011	Mar 11, 2011	Accept	Mar 11, 2011

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Anexo 6: Produção científica no período de Fevereiro de 2007 a Fevereiro de 2011:

Relacionada à tese.

a) Artigos Publicados

ESTRELA-LIMA A, ARAUJO MSS, COSTA-NETO JMC, TEIXEIRA-CARVALHO A., BARROUIN-MELLO SM, MARTINS-FILHO OA, SERAKIDES R, CASSALI GD. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* 2010, **10**:256.

RIBEIRO, LGR, DAMASCENO, KA, COSTA-NETO, JM, D'ASSIS, MJMH, COSTA, AT, SILVA, NS, AGUIAR, PHP, CASSALI, GD, **ESTRELA-LIMA, A**. Expressão da Cox-2 nos carcinomas mamários de cadela. *Veterinária em Foco*, v.6 n.2 p.134-139 jan./jun, 2009.

b) Artigo Aceito para Publicação

ESTRELA-LIMA A, ARAUJO MSS, COSTA-NETO JMC, ROCHA, LGR, DAMASCENO, KA, D'ASSIS MJMH, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA-CARVALHO A, SERAKIDES R, CASSALI GD. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Revista Breast Cancer Research and Treatment*

a) Resumos Publicado em Anais/Periódicos de Eventos

DAMASCENO KA, **ESTRELA-LIMA A**, ARAUJO MSS, COSTA-NETO JM, TEIXEIRA-CARVALHO A, BARROUIN-MELO SM, CARDOSO SV, MARTINS-FILHO O, SERAKIDES R, CASSALI GD. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia. Anais do VI Oncovet & III Simpósio de Oncologia Veterinária, 2010. p. 38-38.

ESTRELA-LIMA A, MOREIRA ELT, CASSALI GD, RIBEIRO LGR, DAMASCENO KA. Condrossarcoma Primário de Mama em Cão: Relato de Caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

ESTRELA-LIMA A. CASSALI GD; SERAKIDES R; BARROUIN-MELO SM, DAMASCENO, KA; CUNHA I; BERTAGNOLLI AC. Carcinoma Mucinoso de Mama em Cadela: Relato de Caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

ESTRELA-LIMA A. CASSALI GD; SERAKIDES R; JOÃO M. COSTA NETO; RIBEIRO LGR; MACÁRIO G; FERREIRA E. Carcinoma Micropapilar Invasivo de Mama em Cadela: Relato de Caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

RIBEIRO LGR, DAMASCENO K, COSTA NETO JM, D'ASSIS MJMH, COSTA, AT, SILVA NS, AGUIAR PHP, CASSALI GD, **ESTRELA-LIMA A.** * Expressão da COX-2 nos carcinomas da mama de cadelas. 35° CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, realizado no período de 19 a 22 de outubro de 2008.

DAMASCENO K, RIBEIRO LGR, COSTA NETO JM, TORIBIO JMML, SILVA NS, AGUIAR PHP, CASSALI GD, **ESTRELA-LIMA A.** Caracterização e quantificação da resposta inflamatória nos carcinomas mamários de cadelas. 35° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), realizado no período de 19 a 22 de outubro de 2008.

Produção científica não relacionada à tese

a) Artigos completos publicados em periódicos

COSTA ACF, SILVA NS, ROCHA VCM, ROSALES-RODRIGUEZ CA, **ESTRELA-LIMA A, MOREIRA ELT, MADRUGA C, ARRUDA SM, FERREIRA-NETO, JS, SILVA MCA, OLIVEIRA, EMD.** Tipificação genética, através da técnica de Spoligotyping, de isolados de *Mycobacterium bovis* em animais abatidos na região metropolitana de Salvador, Bahia Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.2, p.233-237, abr./jun., 2010

D ASSIS MJH, COSTA-NETO JMC, **ESTRELA-LIMA A**, TORIBIO JML, TEIXEIRA RG. Colopexia e deferentopexia associadas à omentopexia na terapêutica cirúrgica da hérnia perineal em cães. *Ciência Rural, UFSM*, v. 40, p. 341-347, 2010

COSTA-NETO JM, TEIXEIRA RG, SA MJC, **ESTRELA-LIMA A**, JACINTO-ARAGÃO GS, TEIXEIRA MW, MARTINS FILHO E F. TORIBIO, JMML, AZEVEDO AS. Farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal (UFBA)*, v. 11, p. 217-230, 2010.

SILVA NS, BARROS IN, DASSO M, MOREIRA ELT, **ESTRELA-LIMA A.**, OLIVEIRA EMD. Detecção de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos do estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal (UFBA)*, v.10, n.4, p.852-859 out/dez, 2009.

SOUZA LN, **ESTRELA-LIMA A**, RIBEIRO LGR, XAVIER M N, SILVA TAM, COSTA EA, SANTOS RL. Systemic canine protothecosis: a case report. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 2, p. 102-106, 2009.

SOUZA TS, COSTA JN, **ESTRELA-LIMA A**, MOREIRA ELT, FERREIRA MM, COSTA A. Intoxicação por monensina em ovinos. *Archives of Veterinary Science*, v.13, n.4, p.280-284, 2009.

CASSALI GD, FERREIRA E, **ESTRELA-LIMA A**, BERTAGNOLLI AC, SOUZA CM. Genética aplicada ao câncer de mama. *Prática Hospitalar*, v. 57, p. 15-17, 2008.

ESTRELA-LIMA A, FERREIRA E, OCARINO NM, MORAES JRC, CASSALI GD, SERAKIDES R. Effect of hypothyroidism on growth, viability, and characteristics of ascitic Ehrlich tumor cells in ovariectomized and non- ovariectomized mice. *Journal of Applied Animal Research*, v. 7, p. 158-166, 2007.

FERREIRA E, **ESTRELA-LIMA A**, SERAKIDES R, GOMES AS, CASSALI GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 1245-1249, 2007.

CASSALI GD, BERTAGNOLLI AC, **ESTRELA-LIMA A**, FERREIRA, E. Microarrays em câncer de mama. *Prática Hospitalar*, v. 9, p. 106-108, 2007.

FERREIRA E, **ESTRELA-LIMA A**, SERAKIDES R, GOMES MG, CASSALI GD. Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. *Pathology, Research and Practice*, v. 19, p. 39-44, 2007.

b) Resumos publicados em anais/periódicos de eventos

COSTA-NETO JM, **ESTRELA-LIMA A**, RIBEIRO LGR, REIS MS, MARTINS FILHO EF, D´ASSIS MJMH, GOMES JUNIOR DC, MORAES VJ. Osteossarcoma mandibular em gato: Relato de caso. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia. Anais do VI Oncovet & III Simpósio de Oncologia Veterinária, 2010.

CASSALI GD, BERTAGNOLLI AC, LAVALLE GE, TAVARES WF, FERREIRA E, **ESTRELA-LIMA A**, CAMPOS, CB. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. In: 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009, São Paulo. Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, 2009.

ESTRELA-LIMA A, COSTA JN, MOREIRA ELT, SANTOS AP, RIBEIRO LGR, VIEIRA-FILHO CH. Rinosinusite Micótica em Ovinos: Relato de Casos. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

SOUZA LN, **ESTRELA-LIMA A**, MOREIRA ELM, RIBEIRO LGR, XAVIER MN, SILVA TMA, COSTA EA, SANTOS RL. Prototecose Sistêmica em Cão: Relato de Caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

MOREIRA ELM, **ESTRELA-LIMA A**, COSTA-NETO JM, RIBEIRO LGR, FARIAS SS, COSTA AT, FALEIRO IM. Carcinoma acinar de glândula salivar em cão: Relato de caso. Encontro Nacional de Patologia Veterinária (ENAPAVE) 2009.

CASSALI GD, **ESTRELA-LIMA** SANTOS AP, RIBEIRO LGR, FERREIRA E, MALTA MCC, COSTA MELT. Linfangioma Inguinal em Onça Pintada (*Panthera onça*): Relato de Caso. 36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2009.

PIRES PG, **ESTRELA-LIMA** A, DAMASCENO KD, RIBEIRO LGR, ALCANTARA A, COSTA AT. Dermatomiosite em cão sem raça definida. 36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2009.

RIBEIRO LGR, GAMA ROG, COSTA-NETO JM, MENESES IDS, DAMASCENO KA, GONÇALVES ACO, **ESTRELA-LIMA** A. Tumor venéreo transmissível canino extragenital com metástase esplênica: Relato de caso. 36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2009.

MOREIRA ELM, **ESTRELA-LIMA** A, RIBEIRO LGR, MUNFORD ND, FARIAS SS, COSTA AT. Quimiodectoma em cão: Relato de caso. 36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2009.

GAMA ROG, RIBEIRO LGR, **ESTRELA-LIMA** A, LIMA CCV, MENESES IDS. Mesotelioma pericárdico em cão: Relato de caso. 36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2009.

CASSALI GD, FERREIRA E, **ESTRELA-LIMA** A, BERTAGNOLLI AC. Testes genéticos em câncer de mama. In: X Simpósio Mineiro de Oncologia, 2008, Belo Horizonte. Revista Prática Hospitalar- Anais do X Simpósio Mineiro de Oncologia. São Paulo: Office, 2008. p. 55-56.

VIEIRA-FILHO CHC, **ESTRELA-LIMA** A, CASSALI GD, SERAKIDES R, MOREIRA ELT, SILVA NS. Quantificação dos índices de proliferação celular e apoptótico no tumor de Ehrlich sob efeito do hipotireoidismo associado ou não à castração. 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), realizado no período de 19 a 22 de outubro de 2008.

c) Apresentação oral em Eventos Científicos

FARIAS, SS; **ESTRELA-LIMA, A**; RIBEIRO, LGRR; D'ASSIS, MJMH. Aspectos clínicos e patológicos das neoplasias mamárias de cadelas.2010. XIII SEMANA DE MOBILIZAÇÃO CIENTÍFICA – SEMOC, 2010, Salvador.

FARIAS, SS; **ESTRELA-LIMA, A**; RIBEIRO, LGRR. Avaliação da expressão da Cox-2 nos linfonodos de cadelas portadoras de carcinomas mamários.2010. XXIX SEMPPG SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA E XI SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, SALVADOR. SEMPPG -UFBA, 2010.

GOMES-JUNIOR, DC; **ESTRELA-LIMA, A**; RIBEIRO, LGRR. Utilização da solução clareadora de gordura na análise de linfonodos em cadelas com carcinoma de mama. In: XXIX SEMPPG SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA E XI SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, SALVADOR. SEMPPG -UFBA, 2010.

DAMASCENO KA, **ESTRELA-LIMA A**, ARAUJO MSS, COSTA-NETO JM, TEIXEIRA-CARVALHO A, BARROUIN-MELO SM, CARDOSO SV, MARTINS-FILHO O, SERAKIDES R, CASSALI GD. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia.

DAMASCENO KA, **ESTRELA-LIMA A**. Avaliação de Linfócitos CD4+ e CD8+ por Citometria de Fluxo nos carcinomas Mamários em Cadelas. 2009. XXVIII SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA E X SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, UFBA, 2009.

RIBEIRO LGR, **ESTRELA-LIMA A**. Avaliação da Expressão do marcador de proliferação, receptor de estrógeno e CD31 nos carcinomas mamários da cadela e suas correlações com a COX-2. In: XXVIII SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA E X SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, SALVADOR. SEMPPG -UFBA, 2009.

DAMASCENO KA, **ESTRELA-LIMA A**, AGUIAR PHP. Caracterização e Quantificação da Resposta inflamatória nos Carcinomas Mamários de Cadelas. 2008. XXVII SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA/IX SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, UFBA, 2008.

RIBEIRO LGR, **ESTRELA-LIMA A**, AGUIAR PHP. Expressão da COX-2 nos carcinomas mamários de cadela. In: SEMPPG -UFBA, 2008, Salvador. XXVII SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PESQUISA/IX SEMINÁRIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, SALVADOR. SEMPPG -UFBA, 2008.

Prêmios e Títulos:

- III Prêmio José Luiz Guerra em Oncologia Veterinária - **Primeiro Lugar – Melhor Trabalho**, Associação Brasileira de Oncologia Veterinária - VI ONCOVET.

Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. In: VI ONCOVET, 2010, Águas de Lindóia.

- Premiações para as publicações em revistas de maior impacto, entre março de 2008 e março 2010. - **Primeiro Lugar** - II Encontro de Patologia da UFMG - 05 a 09 de Julho, Belo Horizonte.

Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer* 2010, **10**:256.

- Trabalho premiado entre os 17 melhores apresentados no 35° CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, realizado no período de 19 a 22 de outubro de 2008 e publicado na Revista Veterinária em Foco.

RIBEIRO LGR, DAMASCENO K, COSTA-NETO JM, D'ASSIS MJMH, COSTA AT, SILVA NS, AGUIAR PHP, CASSALI GD, **ESTRELA-LIMA A.** Expressão da COX-2 nos carcinomas da mama de cadelas.