

**LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO**

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS  
ASSOCIADOS AO TUMOR (MAT) NOS CARCINOMAS  
MAMÁRIOS DE CADELAS: ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS  
CLÍNICOPATOLÓGICOS E SOBREVIDA**

**Belo Horizonte  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG  
FACULDADE DE MEDICINA**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS  
ASSOCIADOS AO TUMOR (MAT) NOS CARCINOMAS  
MAMÁRIOS DE CADELAS: ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS  
CLÍNICOPATOLÓGICOS E SOBREVIDA**

**Belo Horizonte  
2017**

**LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO**

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS  
ASSOCIADOS AO TUMOR (MAT) NOS CARCINOMAS  
MAMÁRIOS DE CADELAS: ASSOCIAÇÃO COM PARÂMETROS  
CLÍNICOPATOLÓGICOS E SOBREVIDA**

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-Orientador: Prof. Dra. Michele Angela Rodrigues

**Belo Horizonte**

**Faculdade de Medicina - UFMG**

**2017**

Monteiro, Lidianne Narducci.  
M775e Estudo das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados ao tumor (MAT) nos carcinomas mamários de cadelas [manuscrito]: associação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida. / Lidianne Narducci Monteiro. - - Belo Horizonte: 2017.  
82f.: il.  
Orientador: Geovanni Dantas Cassali.  
Coorientador: Michele Angela Rodrigues.  
Área de concentração: Patologia Geral.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias da Mama . 2. Macrófagos. 3. Inflamação. 4. Cães. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Cassali, Geovanni Dantas. II. Rodrigues, Michele Angela. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: OZ 200

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA

### LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO

Realizou-se, no dia 04 de agosto de 2017, às 08:30 horas, K3-163 - Sala Nello de Moura Rangel, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Estudo das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados ao tumor (MAT's) nos carcinomas mamários de cadelas: associação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida*, apresentada por LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO, número de registro 2013656151, graduada no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Prof(a). Michele Angela Rodrigues (UFMG), Prof. Remo de Castro Russo (UFMG), Prof. Enio Ferreira (UFMG), Prof(a). Marina De Brot Andrade (AC Camargo Center), Prof(a). Rosemeri de Oliveira Vasconcelos (UNESP - Jaboticabal).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada


Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 04 de agosto de 2017.

  
Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

  
Prof(a). Michele Angela Rodrigues (Doutor)

  
Prof. Remo de Castro Russo (Doutor)

  
Prof. Enio Ferreira (Doutor)

  
Prof(a). Marina De Brot Andrade (Doutor)

  
Prof(a). Rosemeri de Oliveira Vasconcelos (Doutora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados ao tumor (MAT's) nos carcinomas mamários de cadelas: associação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida

**LIDIANNE NARDUCCI MONTEIRO**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 04 de agosto de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Geovanni Dantas Cassali - Orientador  
UFMG

Dra. Michele Angela Rodrigues  
UFMG

Prof. Remo de Castro Russo  
UFMG

Prof. Enio Ferreira  
UFMG

  
Prof(a). Marina De Brot Andrade  
AC Camargo Center

  
Prof(a). Rosemeri de Oliveira Vasconcelos  
UNESP - Jaboticabal

Belo Horizonte, 4 de agosto de 2017.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, minha irmã, meu esposo e à minha filha, Maria Alice.*



## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado meu singelo agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram durante esta caminhada.

À Deus, que sempre me amparou e me permitiu chegar até aqui.

Aos meus queridos pais, que sempre lutaram para que eu pudesse chegar até aqui. Em especial à minha mãe, minha inspiração, obrigada por seu amor incondicional e sua dedicação e incentivo.

À minha irmã e “Dinda”, pela amizade, companheirismo, por estar ao meu lado em todos os momentos, minha grande preciosidade...

Ao meu esposo, companheiro de vida e de Patologia, por sua dedicação, cuidado, carinho, pela ajuda essencial para a realização deste trabalho e principalmente por me dar o meu bem mais preciso desta vida, Maria Alice.

Ao meu orientador Geovanni, por todos os ensinamentos, dedicação, pela amizade e paciência ao longo desse período. Sua dedicação e paixão pela pesquisa são inspiradores!

À minha coorientadora Michele, por ser tão solícita e pelos conselhos. Obrigada pela colaboração na execução das reações de imuno-fluorescência e captura das imagens.

À minha eternal orientadora e inspiradora para seguir o caminho da Patologia, Louisiane. Sua paixão e dedicação ao ensino da Patologia foram minha grande inspiração para seguir nesse caminho. Obrigada pelo incentivo e amizade.

Aos amigos do LPC, Karine, Conrado, Cecília, Liliane, Marina, Istéfani, Stefane, Mirian, Thiago, Emerson e Ivy, obrigada pela amizade, conhecimentos e conselhos compartilhados ao longo desse período!

Aos meus queridos Diego, Fernanda Camargo e Tatiany, pelas risadas e cafés da tarde sempre animados, e pela ajuda imprescindível na execução deste trabalho. Obrigada pela amizade!

À todos os queridos que já passaram pelo LPC ao longo dessa jornada, pela ajuda na rotina diária e por tornar os dias mais alegres e descontraídos!

À IC “emprestada” Izabel, pelo auxílio e ajuda na organização e coleta de dados!

Às minhas amigas-irmãs que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os



momentos dessa longa jornada: Maria Aparecida, Leonita, Larissa, Thaís e Carolina. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e por tornarem essa caminhada mais leve.

À minha família “Narducci”, meus grandes incentivadores. Obrigada pelo apoio, pelo amor e carinho. Família é tudo!

À minha família de BH, que me acolheu e me fez sentir tão querida. Em especial à Bisa Branca, obrigada pelo carinho e cuidado. Com certeza tornaram minha estadia em BH muito mais leve!

Ao professor Remo pelo auxílio na elaboração do projeto de pesquisa e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Professor Dawidson pela colaboração e disponibilidade em ajudar sempre!

À Professora Reneé, pela amizade e pelo material cedido para a execução deste trabalho.

Ao Professor Enio, pelos conselhos e disponibilidade, e pelos materiais cedidos.

Ao Hospital Veterinário/UFMG por disponibilizarem o acervo de dados clínicos.

Aos professores e técnicos do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

À CAPES, CNPq e UFMG pelo apoio para a realização deste trabalho.

Aos meus fiéis companheiros Tetela e Amarelo; ao Pítico pela alegria contagiante e doçura; à Coquinha, que veio para mim no início do meu doutorado, e passou junto comigo todos os momentos, me alegrando nos dias mais tristes. E ao meu eterno amigo e compaheiro, que me inspirou a seguir o caminho dessa profissão...obrigada meu anjinho Nick, um dia vamos nos reencontrar!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...

*Em especial à luz da minha vida, minha inspiração, meu bem mais preciso, minha filha Maria Alice. Seu amor me faz ser forte e me faz buscar a cada dia ser uma pessoa melhor. Te amo infinitamente!*

**Muito obrigada!**



**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.**

## SUMÁRIO

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | ix   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | xi   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | xii  |
| <b>RESUMO</b> .....   | xiv  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | xv   |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 19   |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 21   |
| <b>2.1 Macrófagos e o câncer</b> .....  | 21   |
| 2.1.1 <i>Macrófagos e neoangiogênese</i> .....  | 23   |
| 2.1.2 <i>Macrófagos, migração e invasão vascular</i> .....  | 24   |
| 2.1.3 <i>Papel imunossupressor dos MAT</i> .....  | 25   |
| <b>2.2 Subpopulações e polarização de macrófagos</b> .....  | 26   |
| <b>2.3 Marcadores relacionados aos macrófagos e sua polarização</b> .....   | 28   |
| <b>2.4 MAT e o cancer de mama</b> .....   | 29   |
| <b>3. HIPÓTESES</b> .....   | 32   |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....   | 33   |
| 4.1 <b>Objetivo geral</b> .....   | 33   |
| 4.2 <b>Objetivos específicos</b> .....  | 33   |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 34   |
| 5.1 <b>Pacientes, amostras teciduais e acompanhamento</b> .....   | 34   |
| 5.2 <b>Avaliação Histopatológica</b> .....  | 34   |
| 5.3 <b>Imuno - histoquímica</b> .....   | 35   |
| 5.3.1 <i>Imunoexpressão e quantificação de MAT</i> .....  | 36   |
| 5.3.2 <i>Imunoexpressão de proteínas para avaliações clinico-patológicas</i> .....                                    | 37   |
| 5.4 <b>Imunofluorescência e microscopia confocal a laser</b> .....  | 37   |
| 5.5 <b>Análise estatística</b> .....  | 38   |
| 5.6 <b>Aspectos éticos</b> .....  | 39   |
| <b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 40   |
| <b>ARTIGO 1</b> .....   | 41   |
| <b>ARTIGO 2</b> .....   | 49   |
| <b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....   | 67   |
| <b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....  | 68   |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | 69   |
| <b>10. ANEXOS</b> .....   | 77   |
| <b>Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela</b> .....                                   | 77   |
| <b>Anexo 2 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade</b> ..... | 78   |
| <b>Anexo 3 - Certificado CEUA</b> .....   | 79   |
| <b>APÊNDICES</b> .....  | 80   |

## LISTA DE FIGURAS

|   |   |    |
|---|---|----|
| Figura 1  | Macrófago associado ao tumor, suas funções efetoras e moléculas.  | 23 |
| Figura 2  | Polarização e perfil/fenótipo dos macrófagos M1 e M2.....   | 27 |
| <b>Artigo 1- Tumour-associated macrophages: relation with progression and invasiveness and assessment of M1/M2 macrophages polarization in canine mammary tumours</b> |   |    |
| Figura 1  | Figure 1. Macrophages within a mammary carcinoma in situ/non-invasive area (surrounded by a complete basement membrane) at the center. Permanent red immunohistochemistry, Harris haematoxylin counterstain (x200 magnification).....   | 47 |
| Figura 2  | Figure 2. Macrophages in invasive areas of a mammary tumour revealing a prominent myoepithelial proliferation and associated matrix production. Permanent red immunohistochemistry, Harris haematoxylin counterstain (x400 magnification).....  | 48 |
| Figura 3  | Figure 3. Canine mammary tumour showing macrophages within areas of myoepithelial proliferation and matrix production. Permanent red immunohistochemistry, Harris haematoxylin counterstain (x400 magnification).....   | 48 |
| Figura 4  | Figure 4. Macrophage count according to tumour histotype. Group 1: benign tumours (less aggressive; good prognosis); Group 2: in situ carcinomas; carcinomas in mixed tumours, papillary carcinomas, and tubular carcinomas (intermediate; reserved to poor prognosis); Group 3: solid carcinomas, micropapillary carcinomas, and carcinosarcomas (aggressive behavior; poor prognosis) ( $P = 0.0158$ )..... | 49 |
| Figura 5  | Figure 5. TAM counts and tumor characteristic regarding infiltration pattern/tumour characteristic ( $P=0.0022$ ).....  | 50 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figure 6 | Figure 6. Confocal immunofluorescence images of CMT. NOS2 (pink), CD206 (red), MAC387 (green) and Hoechst (blue) overlay images distinguishing between different macrophage phenotypes. (A) benign tumours with M1 classic population, (B) benign tumours showing a shift from M1 to M2 populations, (C) malignant tumours with a mixed macrophage population, and (D) malignant tumours with a complete M2 subset pattern. Nuclei were revealed by Hoechst staining (blue), and merged images confirmed the cytoplasmatic localization of evaluated proteins. Images are representative of what was observed in three independent experiments. Bars = 20 $\mu$ m..... | 52 |
| Figure 7 | Figure 7. Kaplan–Meier survival analysis for OS based on TAM counts in canine mammary cancer patients (log rank test, $P = 0.0177$ ).....  | 53 |

**Artigo 2 - Prognostic value of tumour-associated macrophages microlocalization in canine mammary carcinomas**

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Figure 1. Canine mammary carcinoma. Infiltrating macrophages can be observed as intraepithelial and stromal TAM. Permanent red immunohistochemistry, Harris haematoxylin counterstain (bar = 50 $\mu$ m).....  | 64 |
| Figura 2 | Figure 2. Canine mammary carcinomas with low (A) and high (B) TAM infiltration. Permanent red immunohistochemistry. Harris haematoxylin counterstain (x20 objective).....  | 65 |
| Figura 3 | Figure 3. Kaplan–Meier survival analysis for OS based on low and high TAM counts in dogs with mammary carcinomas. A) Intraepithelial TAM (log rank test, $P = 0.8439$ ); B) Stromal TAM (log rank test, $P = 0.0500$ ); C) Total TAM (log rank test, $P = 0.0282$ )..... | 66 |

## LISTA DE TABELAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Anticorpos primários utilizados e seus dados..... | 38 |
|----------|---|----|

### **Artigo 1 - Tumour-associated macrophages: relation with progression and invasiveness and assessment of M1/M2 macrophages polarization in canine mammary tumours**

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Table 1. Details of antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence in canine mammary tumours .....   | 44 |
| Tabela 2 | Table 2. Association between tumour-associated macrophage (TAM) counts and clinicopathological characteristics in dogs with mammary tumours characteristics ..... | 46 |
| Tabela 3 | Table 3. Association between tumour-associated macrophage (TAM) counts and histological subtypes in dogs with mammary   | 50 |
| Tabela 4 | Table 4. Survival rates according to TAMs count in canine mammary tumours.....  | 53 |

### **Artigo 2 - Prognostic value of tumour-associated macrophages microlocalization in canine mammary carcinomas**

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Table 1. Association between TAM counts according to histologic location and clinicopathologic features ..... | 62 |
| Tabela 2 | Table 2. Survival rates according to TAM count and histologic location in canine mammary tumours .....        | 63 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANG1:** Angiopoietina-1  
**ANG2:** Angiopoietina-2  
**ARG1:** Arginase-1  
**bFGF:** Fator de crescimento básico de fibroblastos  
**CCL:** Ligante de quimiocinas  
**CCL2:** Ligante de quimiocinas-2  
**CCL3:** Ligante de quimiocinas-3  
**CCL7:** Ligante de quimiocinas-7  
**CCL8:** Ligante de quimiocinas-8  
**CCR2:** Receptor de CCL2  
**CEUA:** Comitê de Ética em Experimentação Animal  
**Cox-2:** Ciclooxygenase-2  
**CSF-1:** Fator estimulador de colônia-1  
**DAB:** 3'3 diaminobenzidina  
**EGF:** Fator de crescimento epidérmico  
**EGFR:** Receptor do fator de crescimento epidérmico  
**FGF:** Fator de crescimento de fibroblastos  
**GM-CSF:** Fator de crescimento de colônia de granulócitos-macrófagos  
**H&E:** Hematoxilina e Eosina  
**HGF:** Fator de crescimento de hepatócitos  
**HIF-1 $\alpha$ :** Fator induzível por hipóxia-1 $\alpha$   
**ICB:** Instituto de Ciências Biológicas  
**IHQ:** Imuno-histoquímica  
**IL:** Interleucina  
**IL-1:** Interleucina-1  
**IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$   
**IL-2:** Interleucina-2  
**IL-4 :** Interleucina-4  
**IL-6 :** Interleucina-6  
**IL-8:** Interleucina-8  
**IL-10:** Interleucina-10  
**IL-12:** Interleucina-12  
**IL-13:** Interleucina-13  
**IFN- $\gamma$ :** Interferon- $\gamma$   
**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzida  
**MAT:** Macrófagos associados ao tumor  
**MCP-1:** Proteína quimioatrativa de macrófagos  
**M-CSF:** Fator estimulador de colônia de macrófagos  
**M-CSFR:** Receptor de fator estimulador de colônia de macrófagos  
**MIF:** Fator inibidor de migração de macrófagos  
**MIP-1 $\alpha$ :** Proteína inflamatória de macrófago-1 $\alpha$   
**MIP-1 $\beta$ :** Proteína inflamatória de macrófago-1 $\beta$   
**MMP:** Metaloproteinase de matriz  
**MMP-2:** Metaloproteinase de matriz-2  
**MMP-9:** Metaloproteinase de matriz-9  
**MSP:** Proteína estimulante de macrófagos  
**NO:** óxido nítrico  
**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PD-ECGF:** fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas

**PDGF:** Fator de crescimento derivado de plaquetas

**PGE2:** Prostaglandina E2

**Th1:** T auxiliar-1

**Th2:** T auxiliar-2

**TMC:** tumores mamários caninos

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral- $\alpha$

**TGF- $\beta$ :** Fator de crescimento transformador- $\beta$

**TGF- $\beta$ 1:** Fator de crescimento transformador- $\beta$ 1

**TP:** timidina fosforilase

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**VEGF:** Fator de crescimento de endotélio vascular

**WHO:** World Health Organization



## RESUMO

Os macrófagos representam um componente importante da população de leucócitos no interior de uma neoplasia, sendo caracterizados como de suma importância para o comportamento tumoral em diversos cânceres nos seres humanos. Entretanto, existem poucas informações disponíveis sobre seu papel nos tumores mamários caninos (TMC). Em razão disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial papel dos macrófagos associados aos tumores (MAT) nos TMC. Para isso, 82 cães fêmeas submetidos à excisão de tumores mamários tiveram seus tumores avaliados histologicamente e por meio de imuno-histoquímica, subsequentemente sendo classificados baseado em baixa ou alta contagem e avaliados de acordo com sua localização em intra-epitelial (MATi), estromal (MATe) e total (MATt). Contagens maiores se mostraram associadas com o estadió clínico e invasão vascular para todas as localizações, apresentando também associação com o tamanho quando avaliadas MATt e com a metástase nodal nas contagens de MATe e MATt. Ademais, houve associação entre altas contagens totais com um perfil carcinomatoso invasor, fato não observado para um perfil não-invasor/*in situ*. Os MATt também se mostraram associados com o histotipos e as taxas de proliferação celular e densidade microvascular nos tumores, tendo tais contagens relação com um pior prognóstico à análise da sobrevivida dos animais. Por meio de microscopia confocal a laser foi demonstrado que quase todos os macrófagos infiltrados nos tumores com altas contagens expressavam a proteína CD206, ao passo que todos os tumores benignos demonstraram imunoexpressão de NOS2, indicando uma mudança do perfil de subpopulações de macrófagos de M1 para M2 nos tumores malignos. Adicionalmente, um padrão de tripla marcação revelou uma população mista M1/M2, caracterizando, assim, um estágio de diferenciação intermediário. Os resultados indicam que os MAT estão relacionados com a invasividade desses cânceres e com o seu potencial metastático nos cães.

*Palavras-chave:* MAT, inflamação, microambiente tumoral, carcinoma mamário, cão.

## ABSTRACT

Macrophages represent a major component of leukocyte populations within neoplasms and are characterized as important for tumor behavior in several human cancers. However, little information regarding its role in canine mammary tumors (CMT) is available. Accordingly, the aim of this study was to address the potential role of tumor-associated macrophages (TAM) in CMT. For that, 82 female dogs had their tumors excised and clinically, histologically, and immunohistochemically evaluated, subsequently classifying tumors as with low or high macrophage counts. They were also categorized as intraepithelial (iTAM), stromal (sTAM), and total (tTAM) TAM. Higher macrophage count was associated with clinical stage and vascular invasion for all TAM categories, while tumor size were also associated with higher tTAM, as well as lymph node metastasis was associated with high sTAM and tTAM counts. Additionally, there was association with higher counts and an invasive tumor profile instead of an in situ carcinomatous pattern. A higher tTAM count was associated with tumor type, high proliferative rates, and vascular microdensity, as well as with a worse prognosis based on survival analysis. Tissue laser confocal microscopy revealed that almost all macrophages infiltrating malignant tumors with high TAM counts expressed CD206 while all benign tumors showed macrophages expressing NOS2, indicating a phenotypic shift from M1 toward M2 macrophage subpopulations in malignant tumors. Additionally, a triple staining pattern revealed a mixed M1/M2 profile in some tumors, characterizing an intermediate state. The results indicate that TAM are related with mammary cancer invasiveness and metastatic potential in dogs.

*Keywords:* TAM, inflammation, tumor microenvironment, mammary carcinoma, dog.

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação, um processo multifatorial que interconecta sinais químicos que dão início e mantém uma resposta do organismo com objetivo de reparar um tecido agredido, é um evento que ocorre seguindo uma lesão tecidual. Isto envolve a ativação e migração direta de leucócitos (por exemplo, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos) do leito vascular em direção aos locais agredidos e lesionados (COUSSENS & WERB, 2002).

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 (COUSSENS & WERB, 2002). A inflamação crônica foi implicada na iniciação e promoção de diferentes cânceres (COUSSENS & WERB, 2002), e nos carcinomas mamários caninos diferentes leucócitos têm sido relacionados como importantes na definição do prognóstico (ESTRELA-LIMA et al., 2010; RAPOSO et al., 2014; RAPOSO et al., 2015). O recrutamento de leucócitos para este local engatilha mudanças no microambiente neoplásico que incluem a produção de intermediários reativos de oxigênio e espécies de nitrogênio, além de citocinas e fatores de crescimento que podem levar à proliferação de células pré-malignas e malignas (CONDEELIS & POLLARD, 2006).

Os macrófagos, presentes no tecido acometido, compreendem o primeiro tipo celular a responder à neoplasia (MANTOVANI et al., 2007) e constituem uma parte significativa do ambiente imunitário das inflamações crônicas, incluindo o microambiente tumoral (SCHMIEDER et al., 2012). Os macrófagos são células derivadas de progenitores hematopoiéticos da medula óssea que entram na circulação sanguínea como monócitos circulantes e migram para os tecidos para se diferenciar em macrófagos. Tais células possuem diversas funções como a fagocitose, secreção de diferentes citocinas, fatores de crescimento, lisozimas, proteases, componentes do complemento, fatores de coagulação e prostaglandinas, todos essenciais no remodelamento tecidual, imunidade e inflamação crônica (AUGER & ROSS, 1992).

Os fagócitos mononucleares são células versáteis que podem expressar diferentes programas funcionais em resposta a sinais microambientais, onde os perfis assim denominados M1 e M2 (ou alternativamente ativado) compreendem extremos de um continuum de estados funcionais. As moléculas e condições do microambiente, como as citocinas e hipóxia, presentes no interior do microambiente neoplásico, tem a capacidade

de dirigir o recrutamento, maturação e diferenciação de leucócitos infiltrantes e têm um papel central na ativação de programas transcricionais específicos expressos por MAT (MANTOVANI et al., 2008). Os macrófagos associados ao tumor (MAT) são conduzidos ao local por citocinas derivadas de células T e citocinas produzidas pelo tumor, e então adquirem o fenótipo M2 (MANTOVANI et al., 2002). A partir das propriedades expressas pelos macrófagos M2 polarizados, os MAT podem participar do crescimento e progressão do tumor, imunidade adaptativa, formação do estroma e angiogênese. In particular, TAMs are a key component of inflammatory circuits that promote tumor progression and metastasis (MANTOVANI et al., 1992).

Assim, os MAT foram relacionados com um pior prognóstico em diversos cânceres humanos, incluindo o câncer de mama da mulher (UENO et al., 2000; WYCKOFF et al., 2004; GOSWAMI et al. 2005). Estudos clínicos e pré-clínicos têm ligado os macrófagos à iniciação, desenvolvimento e metástase (KROL et al., 2011; RAPOSO et al., 2014; SCHMIEDER et al., 2012).

Os MAT induzem a célula neoplásica a expressar antígenos mielóides e outras características fenotípicas de macrófagos, como a capacidade de rolamento, propagação, dissociação, diapedese, migração e invasão. A expressão de genes específicos pelos macrófagos pode induzir a produção de mediadores químicos pró-inflamatórios pelas células tumorais, estimulando o recrutamento de monócitos e sua diferenciação em macrófagos (KROL et al., 2012). Essas células podem promover a metástase pela promoção da neoangiogênese, indução do crescimento neoplásico e aumento da migração e intravasão das células neoplásicas (LEWIS & POLLARD, 2006; KROL et al., 2012).

Nos animais domésticos de companhia, de modo geral, poucos são os estudos relacionados com a investigação do papel dos MAT no câncer, incluindo o câncer de mama. Em razão disso, a realização de estudos que elucidem o papel aplicado dos MAT nas neoplasias mamárias das cadelas são de suma importância e extremamente necessários devido ao seu impacto na Medicina Veterinária, de modo a fornecer informações potencialmente úteis que permitam uma melhor tomada de decisões junto aos pacientes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Macrófagos e o câncer

Os macrófagos constituem um importante componente do sistema imunológico inato e são derivados de células progenitoras mieloides na medula óssea (OSTRAND-ROSENBERG, 2008). Estas células progenitoras se desenvolvem em promonócitos e depois se diferenciam em monócitos. Os monócitos então migram através do sistema circulatório para quase todos os tecidos do corpo, onde se diferenciam em macrófagos teciduais (PICONESE & COLOMBO, 2008).

No microambiente tumoral os macrófagos estão presentes como uma das células do sistema imunitário mais abundantes, levando em consideração o fato do microambiente neoplásico ser um meio complexo que contém células neoplásicas geneticamente heterogêneas e diferentes tipos celulares associados, tais como células endoteliais vasculares, fibroblastos e diferentes populações de células inflamatórias (QIAN & POLLARD, 2010). Acredita-se que os MAT são derivados de monócitos provenientes do sangue periférico recrutados diretamente para o microambiente tumoral, e não derivados de macrófagos teciduais locais (SHIH et al., 2006).

Nos tecidos normais, o desafio patogênico ou a expressão local de uma grande variedade de fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia (*colony stimulating factor/CSF*) -1, o CSF de granulócitos-macrófagos (*granulocyte macrophage colony stimulating factor/GM-CSF*), proteína estimulante de macrófagos (*macrophage stimulating protein/MSP*), fator de crescimento transformador (*transforming growth factor/TGF*) - $\beta$ 1, quimiocinas (citocinas quimiotáticas) que incluem a família de proteínas quimioatratantes de macrófagos -1, -2 e -3 (*chemokine [C-C motif] ligand 2/CCL2* ou *monocyte chemoattractant protein 1/MCP-1*; MCP-2 ou CCL8; MCP-3 ou CCL7), proteína inflamatória de macrófago (*macrophage inflammatory protein/MIP* -1 $\alpha$  /CCL3), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) e fator inibidor de migração de macrófagos (*macrophage migration inhibitory factor/MIF*), juntamente com os produtos oriundos do próprio tecido, recrutam monócitos circulantes e os estimulam a se diferenciar em macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, medeiam respostas imunes, eliminam agentes patogênicos, estimulam a neoangiogênese e influenciam no reparo tecidual (LINGEN, 2001; NATHAN, 2002).

Nos processos neoplásicos, os MAT são recrutados pelas células neoplásicas por meio

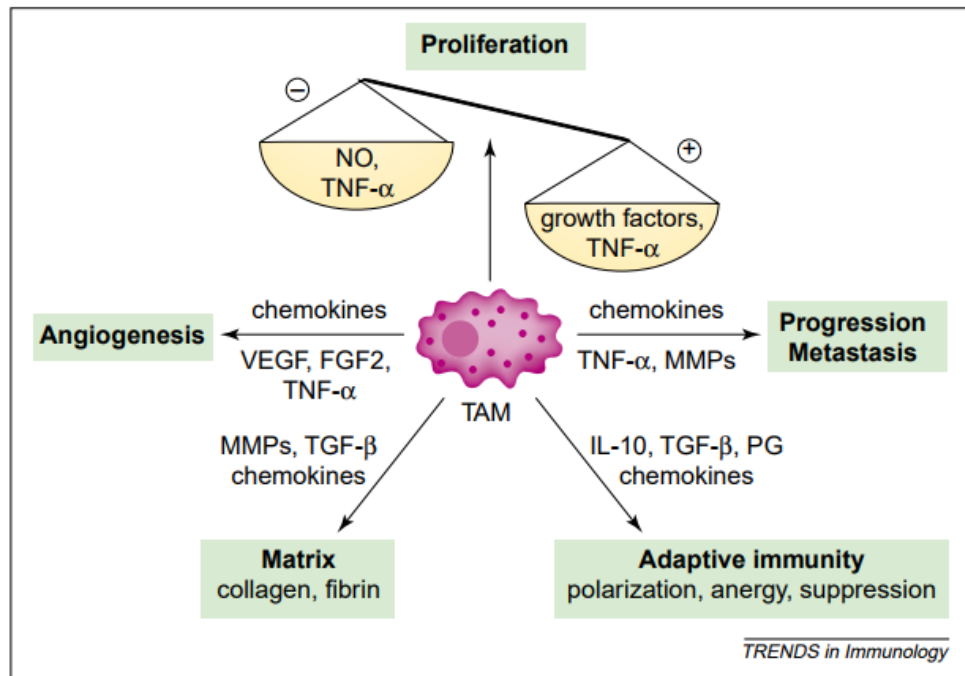
de um processo ligado à liberação de CSF-1 ou M-CSF, fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*/VEGF) e quimiocinas, como o CCL2/MCP-1 (POLLARD, 2008; KROL et al., 2012). O recrutamento dos macrófagos que expressam receptor para CCL2 (CCR2), bem como dos recrutamentos subsequentes dos MAT e suas interações com as células neoplásicas, são dependentes de CCL2 sintetizado pelas células neoplásicas e pelas células do microambiente neoplásico (UENO et al., 2000; QIAN et al., 2012).

A superexpressão de CSF-1, que é o maior regulador de macrófagos (POLLARD, 2009), é associado com prognóstico desfavorável em diversos cânceres, incluindo o câncer de mama, ovário, endometrial, da próstata, hepatocelular e colorretal (LIN et al., 2002; MANTOVANI & SICA, 2010). O CCL2 é também superexpresso em diversos casos de cânceres (MANTOVANI & SICA, 2010) e isto pode estar associado a prognóstico ruim em diversos tumores, incluindo o câncer de mama (TANAKA et al., 2009; YOSHIDOME et al., 2009), considerando que a sua ausência está associada ao aumento da sobrevivência em pacientes com câncer cervical (ZIJLMANS et al., 2006).

Embora as hipóteses originais tenham sugerido que os macrófagos estejam envolvidos na imunidade antitumoral, as mais recentes evidências clínicas e experimentais afirmam que, na maioria dos casos, os MAT estão relacionados com a progressão neoplásica (QIAN & POLLARD, 2010). No sítio primário neoplásico, os MAT estão envolvidos com o apoio à transformação maligna, neoangiogênese, invasão de células tumorais aos tecidos adjacentes, migração e intravasão, bem como com a supressão de respostas imunitárias antitumorais (CONDEELIS E POLLARD, 2006; POLLARD, 2004) (Figura 1). Os macrófagos também potencializam a disseminação e o estabelecimento de células metastáticas em outras localizações, bem como desempenham papéis na iniciação do tumor quando a inflamação é um fator causal (QIAN & POLLARD, 2010). Os MAT também têm sido implicados na resposta às terapias antineoplásica, especialmente devido ao fato de regularem diferentes mecanismos intratecduais importantes para a efetividade de determinados tratamentos (RUFFELL & COUSSENS, 2015).

Estudos clínicos revelaram uma correlação entre uma alta densidade de MAT e prognóstico ruim para diferentes neoplasias. Estes dados são particularmente evidentes para os casos de câncer de mama, próstata, ovário, cervical, endometrial, esofágico e de bexiga (BINGLE, 2002; SHIH et al., 2006). Mais de 80% dos estudos clínicos envolvendo MAT mostram uma correlação significativa entre a densidade de MAT e

prognóstico ruim, enquanto menos de 10% associam a densidade de MAT com um bom prognóstico (BINGLE, 2002). Deste modo, é possível sugerir que a densidade de MAT geralmente está associada com a progressão e metástase neoplásica nos cânceres humanos.



**Figura 1.** Macrófago associado ao tumor, suas funções efetoras e moléculas

### 2.1.1 Macrófagos e neoangiogênese

A neoangiogênese – processo em que novos vasos são gerados a partir de estruturas vasculares pré-formadas ou por meio do recrutamento de células endoteliais de locais de reserva (tais como a medula óssea) de modo a fornecer aporte sanguíneo necessário ao reparo/reconstrução/construção de novos tecidos a partir da replicação celular – tem a hipóxia como de seus principais impulsionadores. Os macrófagos se acumulam em áreas hipóxicas no microambiente neoplásico e são visualizados associados principalmente ao tecido necrótico (MURDOCH et al., 2008).

Nos locais com baixa oxigenação, os macrófagos sintetizam reguladores da neoangiogênese, resultando na formação de novos vasos que permitem um maior crescimento tumoral e acesso de células neoplásicas à circulação (MURDOCH et al., 2008). A infiltração de macrófagos está significativa e positivamente correlacionada com a densidade microvascular em carcinomas de mama invasivos e está associada a uma redução da sobrevida global e da sobrevida livre de doença (LEEK et al., 1996).

O fator induzível por hipóxia (*hypoxia-inducible factor/HIF*) -1 $\alpha$ , cuja expressão é constitutiva em macrófagos, modula o recrutamento de macrófagos para regiões hipóxicas dos tecidos, incluindo aqueles neoplásicos. Este recrutamento ocorre através de quimiocinas, especialmente CCL-2 (MURDOCH ET AL., 2008). No sítio hipóxico, o HIF-1 $\alpha$  regula a transcrição de um painel de vários genes associados com a neoangiogênese, incluindo VEGF (LEWIS & HUGHES, 2007; MURDOCH et al., 2008).

O processo de neoangiogênese envolve uma ampla gama de mediadores solúveis que são estimulantes e inibitórios, incluindo o fator básico de crescimento de fibroblastos (*basic fibroblast growth factor/bFGF*), VEGF, angiopoietinas (angiopoietina-1/ANG-1 e angiopoietina-2/ANG2), interleucina (IL)-1, IL-8, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (*tumor necrosis factor/TNF- $\alpha$* ), timidina-fosforilase (*thymidine-phosphorylase/TP*, também conhecido como fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas – *platelet-derived endothelial cell growth factor/PD-ECGF*), as metaloproteinases de matriz (*matrix metalloproteinase/MMP*) -9 e -2 e óxido nítrico (*nitric oxide/NO*) (BOUDREAU & MYERS, 2003). Nas neoplasias mamárias há uma correlação positiva entre a presença de MAT, níveis de VEGF e densidade microvascular (VALKOVIĆ, et al, 2002).

### 2.1.2 Macrófagos, migração e invasão vascular

Os MAT produzem diversas enzimas proteolíticas que modificam a matriz extracelular. Através da produção de enzimas proteolíticas e MMP, os MAT reorganizam a matriz extracelular e degradam a membrana basal (KESSENBROCK et al., 2010), permitindo que as células tumorais possam invadir o estroma. Este é um passo fundamental na metástase tumoral. Os MAT também produzem uma grande variedade de fatores de crescimento que podem estimular o crescimento e a motilidade das células neoplásicas. Estes incluem o fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor/FGF*), fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor/HGF*), receptor de fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor/EGFR*), fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor/PDGF*, além de outros fatores de crescimento transformantes. (POLLARD, 2004). Estudos de imagem intravital elegíveis mostraram que as interações diretas entre células malignas e MAT são necessárias para migração e intravasão no câncer de mama (WYCKOFF, et al, 2007; GOSWAMI, et al, 2005).



### 2.1.3 Papel imunossupressor dos MAT

Os macrófagos desempenham um papel importante no sistema imunológico, tanto como células efetoras antimicrobianas e tumorícidas, como células imunorreguladoras, que induzem, suprimem ou modulam respostas imunes. A supressão antitumoral das células T pelos MAT é importante para a progressão da neoplasia. Os MAT ajudam a estabelecer um microambiente capaz de facilitar a evasão imunológica do tumor. Embora exista evidência de inibição direta das células T mediada por citocinas produzidas por MAT, como a IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandina E2 (PGE2) também contribuem para a supressão da função citotóxica de células T efetoras e células natural killer (NK) (NG et al., 2013). A produção de citocinas imunossupressoras, como a de IL-10, pelos MAT pode ser estimulada em condições de hipóxia tecidual (MURATA et al., 2002).

O HIF-1 $\alpha$  induzido pela hipóxia também pode promover a progressão do tumor através da evasão imunológica. Usando um modelo murino de câncer de mama, Doedens et al. relataram recentemente que o crescimento tumoral diminuiu com a exclusão de HIF-1 $\alpha$  nos macrófagos, apesar dos níveis normais de VEGF e vascularização tumoral. Neste modelo, as MAT suprimiram a atividade antitumoral de células T infiltrantes nos tumores (DOEDENS *et al.*, 2010). Nas regiões hipóxicas de tumores mamários, os MAT também suprimem a resposta das células T por meio do controle de arginase 1 (Arg1) e óxido nítrico sintase induzida (*inducible nitric oxide synthase*/iNOS) (DOEDENS *et al.*, 2010).

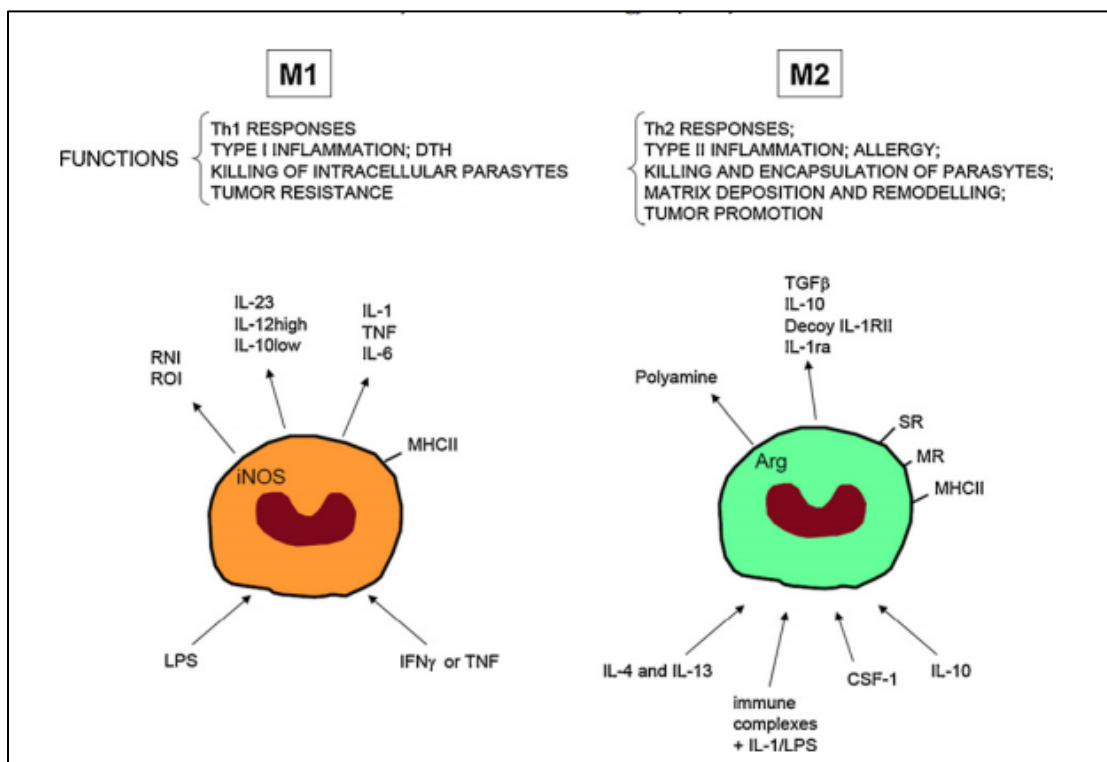
A L-arginina (L-ARG) é metabolizada pela ARG 1, ARG 2 e iNOS (ALBINA et al., 1989). ARG 1 e ARG 2 hidrolizam a L-Arg em ureia e L-ornitina, sendo este o principal substrato para a produção de poliaminas que são necessárias para a progressão do ciclo celular. A L-Arg também pode ser metabolizada por iNOS para produzir citrulina e óxido nítrico, importante na homeostase vascular e nos mecanismos citotóxicos dos macrófagos (efeito tumorícida) (HIBBS et al., 1987). A atividade da ARG elevada já foi descrita em pacientes com várias doenças malignas, incluindo câncer gástrico, de cólon, mama e pulmão (SINGH et al., 2000). Assim, embora arginase-1 (Arg-1) e iNOS tenham papéis opostos na resposta antitumoral dos macrófagos, o metabolismo da arginina-L por ambas as vias inibe a função das células T (RODRIGUEZ et al., 2004).

## 2.2 Subpopulações e polarização de macrófagos

Durante a resposta inflamatória, apesar dos macrófagos iniciarem seu papel por meio da secreção inicial de mediadores inflamatórios que ativam mecanismos de defesa antimicrobianos e que contribuem para a eliminação de organismos invasores – consequentemente, sendo considerados benéficos ao processo – também provocam danos nos tecidos e devem ser controlados rapidamente, para não contribuírem para a progressão da doença. Para equilibrar o potencial prejudicial aos tecidos da resposta inflamatória, macrófagos sofrem apoptose ou se transformam em um fenótipo anti-inflamatório que reduz a resposta pro-inflamatória enquanto facilita a cicatrização de feridas (WYNN et al., 2013).

Devido à esta plasticidade notável que lhes permite responder de forma eficiente aos sinais ambientais, os macrófagos podem alterar seu fenótipo funcional, e sua fisiologia pode ser alterada de forma marcante pelas respostas imunes (MOSSER & EDWARDS, 2008). Na tentativa de imitar a classificação utilizada para as células T, os macrófagos foram classificados em dois fenótipos: M1 e M2. Nesta classificação, a designação M1 foi reservada para macrófagos *classicamente ativados* e a designação M2 para macrófagos *alternativamente ativados* (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2002) (Figura 2).

No processo neoplásico, a inflamação com polarização dos macrófagos desempenha papéis diferentes durante a progressão (SICA et al., 2008). O macrófago *classicamente ativado* está associado à produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-23 e óxido nítrico, e na liberação de citocinas T auxiliar-1 (*T helper-1/Th1*), como lipossacarídeos bacterianos e TNF- $\alpha$ , funcionando, assim, como potentes células efetoras no combate às células neoplásicas com consequente atividade tumoricida (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2013). Tais macrófagos são capazes de induzir a morte de células neoplásicas em diversos tecidos, incluindo o tecido mamário (MANTOVANI & SICA, 2010). Em contraste a isso, os macrófagos *alternativamente ativados* estão associados com a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4 e IL-13, além de estarem envolvidos com o processo de fibrose, no reparo tecidual e na imunidade humoral (MANTOVANI et al., 2002; BISWAS & MANTOVANI, 2010). São induzidos por citocinas T auxiliares-2 (*T helper-2/Th2*), como IL-4, IL-13 e M-CSF (SVENSSON et al., 2011).



**Figura 2.** Polarização e perfil/fenótipo dos macrófagos M1 e M2 (SICA et al., 2008).

Os macrófagos ativados classicamente dão suporte para imunidade antitumoral através da produção de citocinas imunogênicas IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12 (LEEK et al., 2000; KITAMURA et al., 2015), além de possuírem a capacidade de apresentar antígenos tumorais para iniciar a imunidade adaptativa de células T, uma função potencialmente antitumoral (SOLINAS et al., 2009). Essas células também possuem uma capacidade ampliada para eliminar patógenos intracelulares gerando espécies reativas de oxigênio e ativando o gene que codifica iNOS, de modo a produzir óxido nítrico (SOLINAS et al., 2009). Os estímulos derivados de tumores de modo a evadir a resposta tumoricida incluem as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ , glicocorticóides, componentes da matriz extracelular e imunocomplexos (LEEK et al., 2000; KITAMURA et al., 2015).

Ao infiltrar tumores, os macrófagos aumentam a expressão de receptores *scavenger* de manose e galactose, e a produção de VEGF, PGE2 derivada da atuação de ciclooxigenase-2 (Cox-2) e IL-10 (KITAMURA et al., 2015). Os macrófagos M2 mostram atividade fagocítica predominante, expressão acentuada de genes relacionados ao combate imunitário, expressão de receptores de manose e galactose, produção de ornitina e poliaminas através da via da arginase, além de um fenótipo de expressão discreta de IL-12 e acentuada de IL-10 (MANTOVANI et al., 1992). Esse perfil auxilia

na eliminação de agentes microbianos/parasitários, minimizam os efeitos inflamatórios, promovem a remodelação do tecido, bem como a progressão tumoral (MANTOVANI et al., 2002). Deste modo, os macrófagos tanto apresentam atividades que podem combater o desenvolvimento do câncer e difusão das células neoplásicas, como podem simultaneamente suscitar funções para permear o crescimento neoplásico e a progressão neoplásica de acordo com seu estado fenotípico (SICA et al., 2008).

Em suma, ao passo que os macrófagos M1 funcionam como potentes células efetoras no combate à neoplasia, os macrófagos M2 funcionam como promotores da proliferação celular neoplásica por meio da produção de fatores de crescimento relacionados à neoangiogênese, reparo, remodelamento tecidual e atividade imunossupressora (MANTOVANI et al., 2007; SICA et al., 2008). Durante o início do processo de carcinogênese, acredita-se que os macrófagos mostrem mais semelhanças ao fenótipo M1, ao passo que, em estágios mais avançados, células com características M2 são predominantes. (WANG et al., 2011). Assim, MAT promovem o crescimento epitelial e a invasão, que são características comuns do desenvolvimento e do câncer (POLLARD, 2008).

Embora a dicotomia M1 / M2 forneça conveniência, esse sistema subrepresenta o diverso espectro funcional adquirido em resposta a estímulos ambientais complexos e em constante mudança (GAUTIER et al., 2012). Além disso, os macrófagos classicamente e alternativamente ativados representam estados ao longo de um contínuo, onde as características genéticas e moleculares não são mutuamente exclusivas (GAUTIER et al., 2012).

### **2.3 Marcadores relacionados aos macrófagos e sua polarização**

A calprotectina (antígeno leucocitário L1) é uma proteína citosólica ligante de cálcio presente em condições inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos neoplásicos. Assim, a abundante expressão desta proteína por leucócitos, incluindo macrófagos reativos, é de importância biológica significativa na defesa local (BRANDTZAEG et al., 1987). É constituída por duas subunidades (cadeias L1L e L1H) que são idênticas às proteínas chamadas MRP-8 e MRP-14 (ANDERSSON et al., 1988). Além de ser expresso pela maioria dos neutrófilos e epitélio escamoso, o antígeno L1 apresenta uma distribuição restrita dentro da linhagem celular derivada de monócitos, sendo principalmente confinado a histiócitos reativos (macrófagos infiltrantes). O

anticorpo anti-macrófagos MAC387, detecta o antígeno leucocitário L1 (BRANDTZAEG et al., 1987).

O NO, um produto bioativo celular, é crítico para inúmeros processos fisiológicos, incluindo a defesa do hospedeiro contra patógenos, vasodilatação e neurotransmissão (BOGDAN, 2001). Curiosamente, o NO também desempenha papéis críticos na imunossupressão (NIEDBALA & LIEW, 2006). São conhecidas três isoformas distintas de NO: NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS) (Griffith & Stuehr, 1995). Os ligantes TLR e citocinas inflamatórias, incluindo o IFN- $\gamma$ , podem induzir a expressão de iNOS em muitos tipos celulares (NIEDBALA ET AL., 2006). Macrófagos de perfil M1 pró-inflamatórios quando ativados, levam à produção de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de óxido nítrico (NO) devido à indução de óxido nítrico sintase.

O receptor de manose (*manose receptor*/MR; CD206; *mannose receptor 1 C-type*/MRC1) é uma glicoproteína transmembrana que pertence à família das lectinas do tipo C e é expressa predominantemente pela maioria dos macrófagos teciduais, células dendríticas (*dendritic cells*/DCs) e células endoteliais linfáticas e hepáticas selecionadas (TAYLOR et al., 2005). Suas regiões extracelulares incluem um domínio N-terminal rico em cisteína que se liga a glicoproteínas contendo açúcares sulfatados que terminam em 4-SO<sub>4</sub>GalNAc, um domínio de fibronectina II (FNII) e oito domínios de reconhecimento de carboidratos que se ligam a açúcares como manose e fucose com alta afinidade. Uma vez que muitos microorganismos são revestidos com estruturas contendo manose, o MR de macrófago interage com estes (MEDZHITOV, 2007). Nos cânceres, o MR é altamente expresso nos MAT de perfil M2 e não são observados no macrófagos M1 (ALLAVENA et al, 2010), e pesquisas têm mostrado que o MR é um potencial biomarcador para o diagnóstico e terapia anti-cancer (AZAD et al., 2014).

## **2.4 MAT e o câncer de mama**

Os macrófagos podem ocupar mais de cinquenta por cento do componente tumoral uma vez infiltrados no estroma das neoplasias mamárias, tendo sido demonstrada uma correlação entre a densidade de macrófagos e o prognóstico desfavorável dos pacientes (GYORKI & LINDEMAN, 2008; MAHMOUD et al., 2011). Os macrófagos M2 são mais prevalentes no microambiente neoplásico e promovem diretamente o crescimento do câncer de mama através da secreção fatores de crescimento e fatores pro-

angiogênicos (MANTOVANI & SICA, 2010). A infiltração de macrófagos está associada à recidiva tumoral, alto grau histológico e metástase em linfonodos nos tumores mamários (GYORKI & LINDEMAN, 2008; MAHMOUD et al., 2011).

A progressão do câncer de mama pode ser destacada através da relação entre o tumor primário e as células imunitárias especializadas, incluindo monócitos e MAT. O tumor primário é constituído por uma população heterogênea de células, que podem recrutar monócitos da corrente sanguínea principalmente através da secreção de citocinas, CCL2 e CSF-1 (WILLIAN et al., 2016). Evidências mostram que a expressão de CCL2 no microambiente das neoplasias mamárias está fortemente correlacionada com altos níveis de vascularização tumoral, invasão vascular e recidivas (UENO et al., 2000; QIAN et al., 2012). Da mesma forma, uma correlação positiva significativa entre MAT, níveis de VEGF e densidade microvascular é observada nos tumores mamários (VALKOVIC et al., 2002).

Uma vez que os monócitos são recrutados para o tumor primário, essas células podem, então, se diferenciar em MAT. Foi demonstrado que os tumores mamários exibem um ciclo parácrino entre MAT e células do câncer. Os MAT expressam o M-CSFR, que se liga ao CSF-1 secretado por células neoplásicas. Por outro lado, os MAT segregam o EGF e ativam EGFR nas células do câncer. Isso permite a co-migração dos dois tipos de células, assim, aumentando a motilidade e subsequente invasão de tecido e intravasão ao longo do tecido (WYCKOFF et al., 2004). Além de fornecer EGF para as células de câncer de mama, eles também secretam VEGF e IL-8 no microambiente tumoral, o que estimula a neoangiogênese, sendo que a formação de novos vasos sanguíneos em torno do tumor primário fornece oxigênio e nutrientes necessários à proliferação. Além disso, os MAT induzem células do câncer de mama a migrar e entrar na corrente sanguínea, permitindo-lhes atingir locais metastáticos distantes no corpo.

As células do câncer de mama podem migrar para nichos pré-metastáticos em órgãos distais que abrigam um conjunto de MAT, o que permite que as metástases ocorram. Os locais comuns de metástases incluem pulmão e osso, bem como cérebro, fígado e linfonodos. Os MAT encontradas no nicho pré-metastático e locais com formação de focos neoplásicos secundários/metástases exibem expressão de receptores diferentes do que os MAT que interagem com o tumor primário da mama. As células neoplásicas podem interagir com os MAT do nicho pré-metastático, dentro do local metastático,

fazendo com que o ciclo de retroalimentação positivo que ocorre entre o tumor primário e MAT se inicie novamente (WILLIAN et al., 2016)

Nas neoplasias mamárias das cadelas, de maneira semelhante ao que ocorre na mulher, o número de macrófagos associados ao tumor foi relacionado com a ocorrência de metástases (KROL et al., 2011; RAPOSO et al., 2015), crescimento infiltrativo e formação tubular (RAPOSO et al., 2015), ulceração, tipo histológico e sobrevida (RAPOSO et al., 2014). Ainda, o aumento na expressão de MCSF-R foi relacionado ao grau histológico avançado e ocorrência de metástases (KROL et al., 2011). Ademais, a densidade de MAT foi relacionada com a expressão de VEGF nas neoplasias malignas (RAPOSO et al., 2015). Em estudos *in vitro*, as células neoplásicas puderam influenciar o fenótipo dos MAT por meio de CSF-1 e CCL2, com os MAT induzindo as células neoplásicas a estimular a expressão dos receptores para CSF-1 e CCL2, aumentando, assim, a atividade metabólica nas células neoplásicas (BEIRÃO et al., 2015).

Embora o aumento de número de MAT já tenha sido associado à progressão neoplásica e neoangiogênese, o papel dos MAT nas neoplasias mamárias de cadelas ainda necessita de elucidação adicional, particularmente devido ao fato da localização dos macrófagos em tais neoplasias não ter sido investigada até o momento e, especialmente, pelo fato dos subtipos M1 e M2 de macrófagos ainda não terem sido investigados em tal tipo de tumor. Esta relação paradoxal ambivalente entre macrófagos e o câncer reflete a plasticidade funcional destas células, que podem apresentar diferentes programas funcionais em resposta a diferentes sinais do microambiente. Assim, aspectos específicos da presença de macrófagos em tais neoplasias necessitam ser mais bem exploradas visto que dados acerca de seu papel nos tumores mamários das cadelas são escassos.

Por se tratar de frequente causa de morte na espécie, o câncer de mama na cadela é um problema importante na Medicina Veterinária. Apesar dos avanços científicos e tecnológicos, as neoplasias malignas mamárias na cadela são detectadas tardiamente, já quando a lesão se manifestou clinicamente, no momento em que o prognóstico geralmente é pior e é mais difícil a instituição de um tratamento adequado (McCARTHY et al., 2000; MISDORP, 2002), fazendo com que a determinação de potenciais novos biomarcadores passíveis de permitir uma definição prognóstica mais adequada – como os MAT, sejam desejáveis.

### **3. HIPÓTESES**

Acredita-se que os MAT estejam relacionados a um pior prognóstico em diversos cânceres humanos, incluindo o câncer de mama da cadela, estando intimamente ligados à iniciação, desenvolvimento e metástase tumoral. Estes dados sugerem que os animais portadores do tumor com alta expressão de proteínas relacionadas aos macrófagos e sua polarização representam para o animal menor período de sobrevida global devido principalmente aos quadros relacionados com a progressão tumoral e ocorrência de metástase.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Estudar a relevância prognóstica da presença dos MAT nos carcinomas de glândula mamária de cadelas, de modo a avaliar seu papel no processo de progressão neoplásica e metastatização, correlacionando os resultados com os histotipos e graduação das neoplasias, fatores prognósticos e com a taxa de sobrevida dos animais.

### 4.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar a distribuição dos MAT nas neoplasias mamárias de cadelas;
- b) Caracterizar a distribuição dos MAT nas neoplasias mamárias de cadelas nas áreas estromais e intratumorais, e nas áreas *in situ* e invasoras nas neoplasias mamárias de cadelas.
- c) Caracterizar o padrão imunofenotípico dos MAT nas neoplasias mamárias de cadelas;
- d) Analisar a possível relação das mudanças funcionais dos MAT relacionadas à alteração de polarização, fenótipos M1 e M2, com a progressão tumoral e metastização.
- e) Relacionar os dados obtidos com o histotipo e graduação das neoplasias, e com fatores prognósticos estabelecidos para neoplasias mamárias em cadelas.
- f) Analisar a sobrevida global dos animais (determinada pelo método de Kaplan-Meier).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Pacientes, amostras teciduais e acompanhamento

O presente trabalho envolveu uma análise retrospectiva com utilização de amostras provenientes 82 cadelas diagnosticadas com tumores mamários primários entre os anos de 2011 e 2015. Os pacientes foram submetidos a determinação do estadiamento clínico tumoral (TNM) baseado nos critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OWEN, 1980) (ANEXO 1) que se norteiam pela avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica dos animais. Para o estadiamento clínico do animal foram avaliados o tamanho do tumor (T1 de 0-3 cm; T2: 3-5cm; T3: >5cm ), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N0: livre; N1: metastático;) e presença de metástases à distância (M0: sem metástase; M1: com metástase).

Todos os pacientes foram submetidos à procedimento cirúrgico de mastectomia como opção de tratamento, seguido de avaliação microscópica dos tumores removidos. A sobrevida global foi avaliada e determinada como o período a partir da cirurgia até a morte e, ou, final do estudo. As informações sobre os cães foram obtidas por meio de entrevistas telefônicas com os tutores dos animais e por meio da revisão dos dados clínicos disponíveis nas fichas clínicas dos pacientes cadastradas junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais – quando levados em consideração os animais que vieram à óbito na Instituição. Quando os tutores não responderam às entrevistas ou quando os animais morreram devido outras causas, os animais foram censurados.

### 5.2 Avaliação histopatológica

As amostras cirúrgicas foram fixadas em solução de formalina a 10%, neutra e tamponada, sendo amostras representativas rotineiramente processadas e incluídas em parafina, subsequentemente cortadas (secções de 4 µm de espessura) e coradas utilizando-se hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação sob microscopia de luz. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios adotados pela OMS (MISDORP et al., 1999) e por proposições de classificação atualizados (CASSALI et al., 2014). As neoplasias foram categorizadas como benignas (de crescimento expansivo, atipia discreta) ou malignas (carcinomas *in situ*/pré-invasivos e tumores invasores). Quando diagnosticados como carcinomas *in situ*, as lesões representavam somente alterações carcinomatosas pré-invasivas. Por outro lado, tumores com componentes carcinomatosos

*in situ* e invasores tiveram seu histotipos classificado baseado na proliferação com características invasoras. Subsequentemente, os tumores foram graduados histologicamente de acordo com o Sistema de Nottingham adaptado para neoplasias mamárias caninas (KARAYANNOPOULOU et al., 2005; DUTRA et al., 2008) (ANEXO 2). Após o diagnóstico histológico, os pacientes que apresentaram tumores múltiplos tiveram as lesões com o pior prognóstico (por exemplo, maior tamanho, morfologia compatível com neoplasias menos ou pouco diferenciadas) selecionadas para utilização neste estudo, de acordo com o sugerido previamente por outros autores (SORENMO et al., 2013).

### 5.3 Imuno-histoquímica

Para as reações imuno-histoquímicas, secções de 3 µm de espessura foram obtidas a partir dos blocos de parafina e montadas em lâminas de vidro histológicas revestidas com poli-L-lisina. Os cortes foram desparafinizados e reidratados, subsequentemente sendo submetidos a recuperação antigênica por calor por 30 minutos sob 125 °C utilizando o tampão para recuperação antigênica Trilogy<sup>®</sup> (Cell Marque Corporation<sup>®</sup>, Rocklin, CA, Estados Unidos) em uma câmara de pressão úmida (*Pascal Pressure Chamber*<sup>®</sup>, Dako<sup>®</sup>, Carpinteria, CA, Estados Unidos). Foi realizada recuperação antigênica com proteinase K quando aplicável, com incubação subsequente dos tecidos com anticorpos anti-macrophage (clone MAC387, 1:400, AbD Serotec<sup>®</sup>, Oxford, Reino Unido). Tecido nodal linfóide canino foi utilizado como controle positivo para as reações, ao passo que os controles negativos foram obtidos por meio da aplicação de anticorpos primários com isotipo semelhante aos utilizados para detecção. Para a imuno-histoquímica direcionada aos macrófagos, a visualização da reação antígeno-anticorpo foi obtida por meio de utilização do sistema de detecção baseado em polímero (*Envision G2 System/AP, rabbit/mouse*<sup>®</sup>, Dako<sup>®</sup>) com a utilização de cromógeno compatível (*Permanent red substrate-chromogen*<sup>®</sup>, Dako<sup>®</sup>) e visualização sob microscopia de luz. Para os outros anticorpos primários utilizados, a reação antígeno-anticorpo foi visualizada por meio da revelação com 3'3 diaminobenzidina (DAB) (Dako<sup>®</sup>) líquida como cromógeno.

### 5.3.1 Imunoexpressão e quantificação de MAT

A imunorreação foi considerada como positiva para os anticorpos direcionados aos macrófagos quando marcação citoplasmática difusa ou granular (porém, não nuclear) foi observada. A caracterização da célula como macrófago envolveu imunorreatividade positiva ao anticorpo supracitado e à visualização de aspectos morfológicos compatíveis com a de um macrófago, visto que o anticorpo utilizado também possui imunorreatividade positiva para neutrófilos. O número de MAT corados foi contado sem qualquer conhecimento prévio da condição clínica dos pacientes, com avaliação de cinco áreas com maior infiltração (“*hot-spots*”) em cada tumor primeiramente detectadas sob menor magnificação (100x, objetiva de 10x) e então, posteriormente, tendo imagens capturadas sob magnificação de 200x (objetiva de 20x), totalizando uma área de 1 mm<sup>2</sup> para análise. A análise de áreas com maior infiltração/*hot-spots* foi escolhida em detrimento da análise de áreas aleatórias uma vez que são entendidas como biologicamente mais importantes (LEEK et al., 1996; TAKEUCHI et al., 2004). Para a análise dos pontos de corte a serem utilizados, a avaliação das medianas e do caso com metástase à menor contagem de macrófagos total foram considerados para caracterizar os tumores como de infiltração discreta ou acentuada por MAT.

As contagens de macrófagos foram realizadas em áreas diferentes no interior do mesmo tumor, com avaliação tanto de locais com áreas carcinomatosas *in situ* quanto invasoras. De modo a avaliar apropriadamente tais diferenças, as áreas *in situ* foram consideradas como locais de proliferação carcinomatosa não-invasora circundados por uma camada de células mioepiteliais associadas à uma membrana basal contínua. Para distinguir entre macrófagos existentes em áreas intratumorais (ou seja, intra-epiteliais) e estromais, os critérios previamente aplicados por outros autores para macrófagos (GWAK et al., 2015) e baseados na diferenciação de linfócitos intratumorais de estromais (DENKERT et al., 2010; SEO et al., 2013) foram utilizados. Os macrófagos intra-tumorais foram definidos como macrófagos contidos no interior de ninhos de células tumorais ou em contato direto com células neoplásicas epiteliais, ao passo que os MAT estromais foram caracterizados como macrófagos infiltrados no espaço estromal. Após a contagem, o número de macrófagos intratumorais, estromais e totais (soma de ambos os tipos) foi calculada, com utilização dos valores de mediana para cada um dos compartimentos analisados sendo utilizados para a categorização como tumores de infiltração discreta ou acentuada por macrófagos.

### 5.3.2 Imunoexpressão de proteínas para avaliações clínico-patológicas

Para avaliação da imunoexpressão de fator VIII (*factor VIII*), as células foram consideradas como positivas quando observada marcação citoplasmática. Posteriormente, foi realizada contagem por meio do método de Weidner para avaliação de densidade microvascular (WEIDNER, 2008), que consiste na contagem de células ou agregados celulares com imunoexpressão positiva para marcadores vasculares. Para avaliação da imunoexpressão de Ki67, as células foram consideradas como positivas quando observada marcação nuclear. Um sistema automático de contagem foi utilizado para determinação do percentual de células neoplásicas positivas (TUOMINEN et al., 2010). A expressão de EGFR foi detectada por meio de visualização de reação citoplasmática ou membranosa com variação na intensidade de coloração, sendo avaliada de acordo com os critérios determinados no sistema de classificação semi-quantitativo EGFR PharmDx<sup>®</sup> (Dako<sup>®</sup>). As informações sobre os anticorpos primários utilizados estão disponíveis na tabela 1.

### 5.4 Imunofluorescência e Microscopia confocal a laser

A imunofluorescência foi realizada após a recuperação antigênica de secções histológicas de 3 µm de espessura, de maneira semelhante às informações previamente descritas para a realização e reações imuno-histoquímicas. Subsequentemente, os cortes foram imersos em solução tampão salina-fosfato (PBS) e posteriormente incubadas em solução de PBS contendo Triton-X-100<sup>®</sup> 0,2% (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Após, foi realizado bloqueio de proteínas inespecíficas por meio da utilização de solução 1% de soro-albumina bovina (BSA<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Os dados dos anticorpos primários utilizados estão disponíveis na tabela 1. Para a detecção de NOS2, cortes histológicos foram posteriormente incubados com IgG de cabra anti-coelho conjugada com *Alexa Fluor 647*<sup>®</sup> (1:1000, Life Technologies<sup>®</sup>, Gaithersburg, MD, Estados Unidos). Os núcleos foram contracolorados com Hoescht 33342 (Life Technologies<sup>®</sup>). Então, as amostras foram lavadas três vezes com PBS por 10 minutos e montadas com um reagente para prevenir desaparecimento gradual da expressão visualizável (Prolong Gold Antifade Reagent<sup>®</sup>, Life Technologies<sup>®</sup>). Controles negativos foram incluídos em todas as reações por meio da omissão da utilização dos anticorpos primários. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio confocal Zeiss<sup>®</sup> 880<sup>®</sup> (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Jena, Alemanha) e lente objetiva a óleo de 40x 1.3. As amostras foram excitadas sob as seguintes especificações: 405 nm e observadas a 415-480 nm para detecção de Hoescht 33342; 488 nm e observadas a 500-

525 nm para detectar FITC; sob 544 nm e observadas a 695 nm para detectar R-PE; e 630 nm e observadas a 755 nm para *Alexa Fluor 647*<sup>®</sup>. Todas as proteínas marcadas avaliadas por meio de análise confocal foram localizadas no citoplasma das células neoplásicas. O programa computacional *Zeiss Efficient Navigation (ZEN)*<sup>®</sup> para sistema operacional Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup> foi utilizado para análise espectral.

**Tabela 1.** Anticorpos primários utilizados e seus dados.

| Anticorpo primário        | Fonte      | Clone      | Diluição | Fabricante                   | Conjugado | Recuperação antigênica | Incubação  |
|---------------------------|------------|------------|----------|------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| <i>Imuno-histoquímica</i> |            |            |          |                              |           |                        |            |
| Macrophage                | Camundongo | MAC387     | 1:400    | AbD Serotec <sup>®</sup>     | -         | RCU                    | ON, 4 °C   |
| Factor VIII               | Coelho     | Policlonal | 1:1200   | Dako <sup>®</sup>            | -         | RCU                    | ON, 4 °C   |
| Ki67                      | Camundongo | MIB1       | 1:50     | Dako <sup>®</sup>            | -         | RCU                    | ON, 4 °C   |
| EGFR                      | Camundongo | 31G7       | 1:100    | Invitrogen <sup>®</sup>      | -         | Proteinase K           | ON, 4 °C   |
| <i>Imunofluorescência</i> |            |            |          |                              |           |                        |            |
| S100A8/A9 Complex         | Camundongo | MAC387     | 1:400    | Abcam <sup>®</sup>           | FITC      | RCU                    | ON, 4 °C   |
| CD206                     | Camundongo | 3.29B1.10  | 1:100    | Beckman Coulter <sup>®</sup> | R-PE      | RCU                    | 1 hora, TA |
| NOS2                      | Coelho     | Policlonal | 1:100    | Santa Cruz <sup>®</sup>      | -         | RCU                    | 1 hora, TA |

RCU: recuperação com calor úmido; ON: *overnight*; TA: temperatura ambiente; FITC, isotiocianato de fluoresceína; R-PE, ficoeritrina-R.

## 5.5 Análise Estatística

A infiltração por MAT foi comparada utilizando-se análise de variância (ANOVA) com valores de MAT utilizados como variáveis contínuas. A correlação entre o número de macrófagos e características clinico-patológicas dos tumores foi avaliada por meio da correlação de Spearman, sendo utilizado o teste U de Mann-Whitney para comparação entre localizações histológicas diferentes. Curvas de sobrevivência foram produzidas utilizando-se o método de Kaplan-Meier, com avaliação de diferenças na sobrevivência analisadas por meio do uso do teste de *log rank*. As análises foram realizadas utilizando-se o programa computacional para sistema operacional Microsoft<sup>®</sup> Windows<sup>®</sup>, Prism<sup>®</sup> (versão 6,0, GraphPad<sup>®</sup>, San Diego, CA, Estados Unidos). Os resultados foram considerados como estatisticamente significativos quando  $P \leq 0,05$ .

## **5.6 Aspectos éticos**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG) sob protocolo nº 81/2013 (ANEXO 3).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados durante o período de doutoramento.



**ARTIGO 1****Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours**

Publicado no periódico *The Veterinary Journal*.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

Original Article

## Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours

L.N. Monteiro<sup>a</sup>, M.A. Rodrigues<sup>a,b</sup>, D.A. Gomes<sup>b</sup>, B.S. Salgado<sup>c</sup>, G.D. Cassali<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-091 Belo Horizonte, Brazil<sup>b</sup> Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-091 Belo Horizonte, Brazil<sup>c</sup> Laboratório de Imunopatologia (Life), Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, 29043-900 Vitória, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 22 February 2018

## Keywords:

Canine  
Inflammation  
Mammary tumour  
Tumour-associated macrophages  
Tumour microenvironment

## ABSTRACT

Macrophages represent a major component of the overall leucocyte population within neoplasms and are important for tumour behaviour in several cancers in human beings. However, little information regarding their role in canine mammary tumours (CMTs) is available. The aim of this study was to address the potential role of tumour-associated macrophages (TAMs) in CMTs. TAMs in CMTs excised from 82 female dogs were quantified at high power (400× magnification) and categorised as low ( $\leq 50$ ) or high ( $> 50$ ) TAM counts. Higher TAM counts were associated with clinical stage ( $P < 0.001$ ), tumour type ( $P = 0.016$ ), tumour size ( $P = 0.013$ ), vascular invasion ( $P = 0.031$ ), lymph node metastasis ( $P = 0.003$ ), high proliferation rates ( $P = 0.009$ ), vascular microdensity ( $P = 0.008$ ), invasive tumour profile ( $P = 0.002$ ) and worse prognosis ( $P = 0.018$ ; hazard ratio = 0.283). Almost all macrophages infiltrating malignant tumours with high TAM counts expressed CD206 (macrophage mannose receptor 1), while all benign tumours were infiltrated by macrophages expressing inducible nitric oxide synthase (NOS2), suggesting a phenotypic shift from classically activated macrophage (M1) subpopulations towards alternatively activated macrophage (M2) subpopulations in malignant tumours. A triple staining pattern revealed mixed M1/M2 profiles in some tumours, thus characterising an intermediate state. The results indicate that TAMs are associated with more aggressive types of mammary cancer in dogs.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Intrinsic patterns of host immune response and infiltrating leucocytes might guide cancer progression (De Nardo and Coussens, 2007). In human beings and dogs, tumour-associated macrophages (TAMs) have been identified as important components of the tumour microenvironment, since they are a major proportion of the leucocytic infiltrate, promoting tumour cell invasion and migration, as well as suppressing anti-tumour responses (Pollard, 2004; Condeelis and Pollard, 2006; Raposo et al., 2014, 2015). Although it has been suggested that macrophages are involved in anti-tumour immunity, there is substantial evidence that TAMs enhance tumour progression to malignancy

through variation in macrophage subsets (Qian and Pollard, 2010; Murray and Wynn, 2011).

Polarisation of major macrophage subsets into classically activated (M1) and alternatively activated (M2) subsets has been reported in cancer and inflammation. M1 macrophages exhibit anti-tumour activity by mediating host defence against microorganisms and cancer cells, while M2 macrophages have an anti-inflammatory function and pro-tumoural effect, since they are active during tissue remodelling and neoangiogenesis, both of which can be related to tumour progression and metastasis (Murray and Wynn, 2011).

There are relatively few studies describing TAM infiltration patterns and their relationship with progression and prognosis in tumours in dogs (Krol et al., 2012; Raposo et al., 2014, 2015). The aim of the present study was to investigate the characteristics of TAM infiltration and populations in canine mammary tumours

\* Corresponding author.

E-mail address: [cassali@icb.ufmg.br](mailto:cassali@icb.ufmg.br) (G.D. Cassali).

(CMTs) and their potential role as a prognostic marker in these tumours.

## Materials and methods

### Study population, classification of mammary tumours and follow-up

This retrospective study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (protocol number 81/2013; date of approval 19th November 2013) and included 82 female dogs diagnosed with primary CMTs from 2011 to 2015. CMTs were staged from I to V according to Owen (1980) and surgically excised. Histopathological evaluation was performed on routine formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) sections stained with haematoxylin and eosin.

Tumours were categorised according to the World Health Organization (WHO) classification scheme for CMTs (Misdorp et al., 1999), incorporating updated classification proposals (Cassali et al., 2014). Tumours were classified as benign (expansive growth, low degree of atypia) or malignant (pre-invasive in situ carcinomas and invasive tumours); in situ carcinomas were defined as sites of non-invasive carcinomatous proliferation surrounded by a myoepithelial cell lining with a continuous basement membrane according to Cassali et al. (2014). In tumours with both in situ and invasive components, the histological classification was based on features of the invasive growth. Subsequently, the Nottingham grading system (Karayannopoulou et al., 2005) was applied. When dogs were presented with multiple tumours, the tumour with the most aggressive clinical and histopathological features (larger size, infiltrative growth and undifferentiated histology) was selected for inclusion in the study (Sorenmoe et al., 2011).

Tumour subtypes were grouped into three categories according to biological behaviour and prognosis based on Santos et al. (2013): group 1: benign tumours (less aggressive; good prognosis); group 2: in situ carcinomas, carcinomas in mixed tumours, papillary carcinomas and tubular carcinomas (intermediate; reserved to poor prognosis); and group 3: solid carcinomas, micropapillary carcinomas, and carcinosarcomas (aggressive behaviour; poor prognosis).

Overall survival (OS) was characterised as the time from surgery/tumour removal to the date of animal death/euthanasia due to tumour-related causes and/or the end of the study. Follow-up data were obtained by telephone interviews with owners and by reviewing the clinical data available for animals that died at our institute. Minimum, maximum and mean survival time values were determined. When the owners did not answer the telephone calls, or when animals died from other causes, data were censored; seven animals were censored because they were lost to follow-up. Dogs with benign tumours (six cases) were not included in the survival analysis, in view of the good prognosis due to the non-invasive nature of their tumours.

### Immunohistochemistry and confocal microscopy

FFPE sections (3 µm thick) for immunohistochemistry and confocal microscopy were deparaffinised, rehydrated and subjected to heat-induced epitope/antigen retrieval (HIER) for 30 s at 125 °C using an antigen retrieval buffer (Trilogy, Cell Marque Corporation) in a pressure chamber (Pascal Pressure Chamber, Dako) and proteinase K, when appropriate. The antibodies used in this study are summarised in Table 1. An unaffected canine lymph node was used as a positive control, while negative controls were sections treated with isotype-matched primary antibodies (rabbit and mouse anti-human IgG, Dako). Immunohistochemical staining for anti-macrophage markers was revealed using a polymer-based detection system (Envision G2 System/AP, Rabbit/Mouse, Dako), with liquid permanent red as the chromogen (Permanent Red Substrate-Chromogen, Dako). Antigen-antibody reactions for other antibodies were revealed using 3'-3' diaminobenzidine (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako) as the chromogen. Sections were evaluated by routine light microscopy.

Immunofluorescence was performed as described by Rodrigues et al. (2016). Tissue sections were incubated with Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000, Life Technologies) for detection of inducible nitric oxide synthase (NOS2). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Life Technologies). Images were collected using a LSM Zeiss 880 confocal microscope (Carl Zeiss). Samples were excited at 405 nm and observed at 415–480 nm for detection of Hoechst 33342, excited at 488 nm and observed at 500–525 nm for detection of fluorescein isothiocyanate (FITC), excited at 543 nm and observed at 550–630 nm for detection of R-phycoerythrin (R-PE), and excited at 630 nm and observed at 650 nm for detection of Alexa Fluor 647. Zeiss Efficient Navigation (ZEN) software was used for spectral analysis.

### Immunolabelling and macrophage quantification by immunohistochemistry and confocal microscopy

Anti-macrophage immunoreactivity was considered to be positive when diffuse or granular cytoplasmic staining (but not nuclear staining) was observed in cells showing macrophage morphology, since other cells (e.g. neutrophils) can also be stained by the same antibody. Cells were considered to be positive for factor VIII associated factor (von Willebrand's factor) when cytoplasmic staining was observed; stained cells were counted according to Weidner (2008). An automated counting application was used to determine the percentage of neoplastic cells positive for Ki67 (nuclear immunostaining) (Tuominen et al., 2010). Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression was detected as membranous and/or cytoplasmic brown staining of neoplastic cells with variation in staining intensity and was evaluated according to EGFR PharmDx recommendations (Dako).

TAMs were counted in each tumour in five 'hot spot' areas (areas of maximum leucocytic infiltration) first observed at low magnification and then captured at 400× magnification. The total number of TAMs was determined for each tumour by adding up the counts of all areas. A count of 50 infiltrating macrophages in five 400× high power fields (1 HPF = 0.22 mm<sup>2</sup>) was designated as the arbitrary cut-off to separate tumours into those with low ( $n \leq 50$ ) and high ( $n > 50$ ) numbers of infiltrating macrophages.

Benign tumours ( $n = 5$ ) and malignant tumours (solid carcinomas and carcinomas in mixed tumours;  $n = 12$ ) with high macrophage counts were evaluated to characterise infiltration by M1 and M2 macrophages using a mouse anti-human MAC387, rabbit anti-human NOS2 (M1) and mouse anti-human CD206 (M2) antibody (Table 1). All antibodies were previously documented as suitable for detection of epitopes in canine tissues (Ricklin et al., 2010; Sanches et al., 2014; Raposo et al., 2014, 2015).

### Statistical analysis

TAM infiltration among different CMT histotypes was compared using analysis of variance (ANOVA) with the TAM value as a continuous variable. Correlation between the number of macrophages and clinicopathological features was assessed using Spearman's rank order correlation or the Mann-Whitney *U* test, which was used for comparison between in situ and invasive areas. Survival curves were produced using the Kaplan-Meier method and differences in OS between dogs were evaluated using the log rank test. Results were considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Clinical and histopathological data

The mean age of 82 dogs included in the study was 8 years (range 4–20 years). Tumours were classified as carcinomas in mixed tumours ( $n = 27/82$ ; 32.9%), papillary carcinomas ( $n = 11$ ;

**Table 1**  
Details of antibodies used for immunohistochemistry and immunofluorescence in canine mammary tumours.

| Antibody                      | Source | Clone      | Dilution | Manufacturer    | Conjugate | Antigen retrieval | Incubation |
|-------------------------------|--------|------------|----------|-----------------|-----------|-------------------|------------|
| <b>Immunohistochemistry</b>   |        |            |          |                 |           |                   |            |
| Macrophage                    | Mouse  | MAC387     | 1:400    | AbD Serotec     | –         | HIER              | ON 4 °C    |
| Factor VIII-associated factor | Rabbit | Polyclonal | 1:1200   | Dako            | –         | HIER              | ON 4 °C    |
| Ki67                          | Mouse  | MIB1       | 1:50     | Dako            | –         | HIER              | ON 4 °C    |
| EGFR                          | Mouse  | 31G7       | 1:100    | Invitrogen      | –         | Proteinase K      | ON 4 °C    |
| <b>Immunofluorescence</b>     |        |            |          |                 |           |                   |            |
| S100A8/A9 complex             | Mouse  | MAC387     | 1:400    | Abcam           | FITC      | HIER              | ON 4 °C    |
| CD206                         | Mouse  | 3.29B1.10  | 1:100    | Beckman Coulter | R-PE      | HIER              | 1 h RT     |
| NOS2                          | Rabbit | Polyclonal | 1:100    | Santa Cruz      | –         | HIER              | 1 h RT     |

EGFR, epidermal growth factor receptor; FITC, fluorescein isothiocyanate; R-PE, R-phycoerythrin; HIER, heat-induced epitope/antigen retrieval; NOS2, inducible nitric oxide synthase; ON, overnight; RT, room temperature.

13.5%), solid carcinomas ( $n = 11$ ; 13.5%), micropapillary carcinomas ( $n = 7$ ; 8.5%), tubular carcinomas ( $n = 7$ ; 8.5%), benign tumours ( $n = 7$ ; 8.5%), carcinosarcomas ( $n = 6$ ; 7.3%) and in situ/non-invasive carcinomas ( $n = 6$ ; 7.3%). Amongst invasive tumours, 14/69 (20.3%) were high grade (grade 3) tumours, 33 (47.8%) were intermediate grade (grade 2) tumours and 22 (31.9%) were low (grade 1) tumours. Amongst malignant neoplasms, 23/75 (30.7%) had vascular invasion and 32 (42.7%) had nodal metastasis.

#### Macrophage counts and clinicopathological features

Clinicopathological data in relation to TAM counts are summarised in Table 2. TAMs positive for MAC387 were observed in all tumour types and showed moderate to intense cytoplasmic staining. TAMs were observed as single cells or densely packed clusters with heterogeneous distribution, frequently observed within the stroma of the tumour front, within necrotic areas, and around or within tumour nests of in situ/non-invasive mammary carcinomas (Fig. 1A) and/or areas of invasion (Fig. 1B). Occasional individual TAMs were observed in areas of myoepithelial proliferation, or within chondroid or osteoid matrix, in mixed tumours, and in benign tumours (Fig. 1C). TAMs were also observed in peritumoural tissues and in normal mammary tissue. The range of TAM counts summed for five HPFs was from 15 (13 TAMs/mm<sup>2</sup>) in a carcinoma in a mixed tumour to 1060 (963 TAMs/mm<sup>2</sup>) in a solid carcinoma.

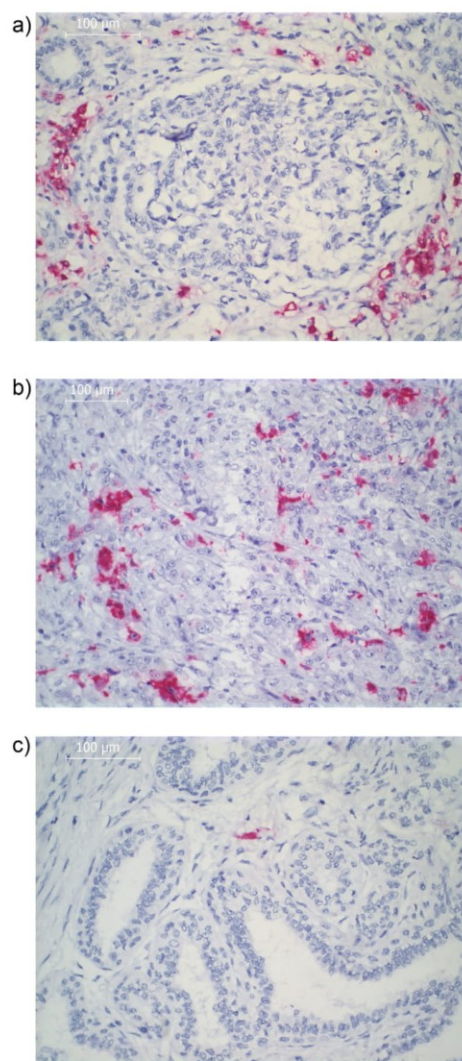
When analysed according to tumour subtype (Santos et al., 2013), TAM counts increased with grade of tumour from 1 to 3 ( $P = 0.016$ ; Fig. 2; Table 3). There were statistically significant differences in TAM counts between groups 1 and 2 ( $P < 0.005$ ), and between groups 1 and 3 ( $P < 0.005$ ). Solid carcinomas had the highest TAM counts. There was a statistically significant difference

**Table 2**

Association between tumour-associated macrophage (TAM) counts and clinicopathological characteristics in dogs with mammary tumours.

| Clinicopathological characteristics | TAM count  |            | P value             |
|-------------------------------------|------------|------------|---------------------|
|                                     | Low        | High       |                     |
| <b>Tumour size</b>                  |            |            |                     |
| T1 (<3 cm)                          | 11 (13.4%) | 20 (24.4%) | 0.013 <sup>*</sup>  |
| T2 (3–5 cm)                         | 2 (2.4%)   | 18 (22.0%) |                     |
| T3 (>5 cm)                          | 3 (3.7%)   | 28 (34.1%) |                     |
| <b>Lymph node metastasis</b>        |            |            |                     |
| No                                  | 15 (18.3%) | 36 (43.9%) | 0.003 <sup>*</sup>  |
| Yes                                 | 1 (1.2%)   | 30 (3.7%)  |                     |
| <b>Distant metastasis</b>           |            |            |                     |
| No                                  | 16 (19.5%) | 64 (78.0%) | 0.484               |
| Yes                                 | 0          | 2 (2.4%)   |                     |
| <b>Clinical stage (Owen, 1980)</b>  |            |            |                     |
| I                                   | 13 (15.9%) | 15 (18.3%) | <0.001 <sup>*</sup> |
| II                                  | 1 (1.2%)   | 8 (9.8%)   |                     |
| III                                 | 1 (1.2%)   | 12 (14.6%) |                     |
| IV                                  | 1 (1.2%)   | 29 (35.4%) |                     |
| V                                   | 0          | 2 (2.4%)   |                     |
| <b>Histological grade</b>           |            |            |                     |
| I                                   | 5 (8.2%)   | 18 (29.5%) | 0.061               |
| II                                  | 4 (6.6%)   | 19 (31.1%) |                     |
| III                                 | 0          | 15 (24.6%) |                     |
| <b>Necrosis</b>                     |            |            |                     |
| No                                  | 11 (13.4%) | 28 (34.1%) | 0.068               |
| Yes                                 | 5 (6.1%)   | 38 (46.3%) |                     |
| <b>Skin ulceration</b>              |            |            |                     |
| No                                  | 16 (19.5%) | 57 (69.5%) | 0.117               |
| Yes                                 | 0          | 9 (11.0%)  |                     |
| <b>Vascular invasion</b>            |            |            |                     |
| No                                  | 15 (18.3%) | 44 (53.7%) | 0.031 <sup>*</sup>  |
| Yes                                 | 1 (1.2%)   | 22 (26.8%) |                     |

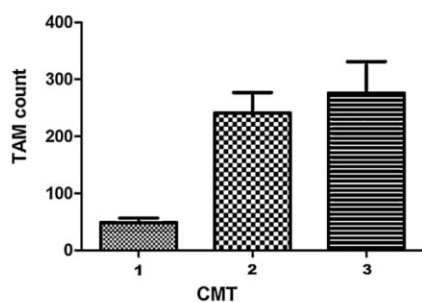
Low  $\leq 50$  TAMs in five high power fields (HPFs); High  $> 50$  in five high power fields.  
<sup>\*</sup> P value  $< 0.05$  considered to be statistically significant.



**Fig. 1.** (A) Macrophages within a mammary carcinoma in situ/non-invasive area (surrounded by a complete basement membrane) at the centre. Papillary mammary carcinoma. (B) Macrophages in invasive areas of a mammary tumour with predominantly myoepithelial proliferation and associated matrix production. Carcinoma in mixed mammary tumour. (C) Canine mammary tumour showing macrophages within areas of myoepithelial proliferation and matrix production. Carcinoma in mixed mammary tumour. Immunohistochemistry with anti-macrophage/MAC387 antibody, permanent red chromogen and Harris haematoxylin counterstain (scale bars: A and B = 50  $\mu$ m; C = 20  $\mu$ m).

between TAM counts in invasive carcinomas and in situ/non-invasive carcinomas ( $P = 0.002$ ; Fig. 3).

TAM counts increased with clinical stage ( $P < 0.001$ ; Spearman's rank order correlation coefficient  $r_s = 0.453$ ). An association



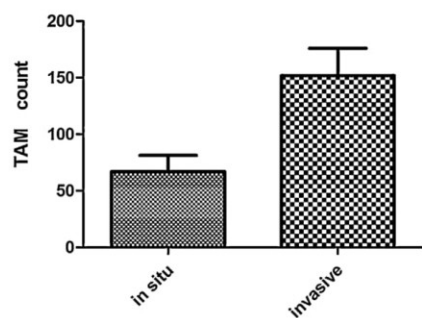
**Fig. 2.** Macrophage count according to tumour histotype: group 1: benign tumours (less aggressive; good prognosis); group 2: in situ carcinomas, carcinomas in mixed tumours, papillary carcinomas and tubular carcinomas (intermediate; reserved to poor prognosis); and group 3: solid carcinomas, micropapillary carcinomas and carcinosarcomas (aggressive behaviour; poor prognosis) ( $P=0.0158$ ).

**Table 3**

Association between tumour-associated macrophage (TAM) counts and histological subtypes in dogs with mammary tumours.

| Group | Histotype (Santos et al., 2013) | TAM count |            | P value            |
|-------|---------------------------------|-----------|------------|--------------------|
|       |                                 | Low       | High       |                    |
| 1     | Benign tumour                   | 2 (2.4%)  | 5 (6.1%)   | 0.016 <sup>*</sup> |
|       | In situ carcinoma               | 5 (6.1%)  | 1 (1.2%)   |                    |
| 2     | Carcinoma in mixed tumour       | 3 (3.7%)  | 24 (29.3%) |                    |
|       | Papillary carcinoma             | 3 (3.7%)  | 8 (9.8%)   |                    |
|       | Tubular carcinoma               | 1 (1.2%)  | 6 (7.3%)   |                    |
| 3     | Solid carcinoma                 | 1 (1.2%)  | 10 (12.2%) |                    |
|       | Micropapillary carcinoma        | 0         | 7 (8.5%)   |                    |
|       | Carcinosarcoma                  | 0         | 6 (7.3%)   |                    |

Low  $\leq 50$  TAMs in five high power fields (HPFs); High  $> 50$  in five high power fields.  
<sup>\*</sup> P value  $< 0.05$  considered to be statistically significant.



**Fig. 3.** Tumour-associated macrophage (TAM) counts in in situ and invasive canine mammary carcinomas ( $P=0.002$ ).

was also observed between increased TAM infiltration and tumour size ( $P=0.013$ ;  $r_s=0.276$ ), presence of vascular invasion ( $P=0.031$ ;  $r_s=0.239$ ) and lymph node metastasis ( $P=0.003$ ;  $r_s=0.320$ ). We did not observe statistically significant relations between TAM and intratumoural necrosis, skin ulceration, histological grade or distant metastasis ( $P>0.05$ ; Table 2). A statistically significant association was observed between TAM counts and vascular microdensity ( $P=0.008$ ;  $r_s=0.314$ ), as well as between TAM and Ki67 counts ( $P=0.009$ ;  $r_s=0.295$ ). Mammary tumours from all

dogs had positive cytoplasmic immunoeexpression of EGFR; there was no significant association between EGFR expression and TAM counts ( $P=0.204$ ; Table 4).

#### M1/M2 macrophage subpopulations in benign and malignant tumours

NOS2 was expressed in macrophages (MAC387 positive cells with macrophage-like morphology) in all five benign mammary tumours evaluated (5/5, 100%), while CD206 was expressed in 2/5 (40%) benign tumours; this profile is consistent with a predominantly M1 profile. In 12 malignant mammary tumours (six solid carcinomas and six carcinomas in mixed tumours), there was expression of CD206 in MAC387 positive macrophages in 4/6 (66.7%) solid carcinomas and 4/6 (66.7%) carcinomas in mixed tumours, while there was expression of NOS2 in MAC387 positive macrophages in 4/6 (66.7%) solid carcinomas and 1/6 (16.7%) carcinomas in mixed tumours; this profile is more consistent with a predominantly M2 profile. A triple staining pattern (MAC387 positive, NOS2 positive, CD206 positive; Fig. 4) was observed in all tumour types, with 2/5 (40%) benign tumours, 2/6 (33.3%) solid carcinomas and 1/6 (16.7%) carcinomas in mixed tumours showing this immunolabelling profile. Statistical analysis was not performed on this data in view of the low number of cases in each group.

#### Tumour-associated macrophages and clinical outcome

Survival data were analysed for 69 dogs, excluding the six dogs with benign tumours and the seven dogs that were censored because they were lost to follow up; 22/69 dogs (all of which had high TAM counts) died spontaneously from causes related to mammary tumours. There was a significant relationship between TAM infiltration and overall survival amongst dogs with malignant tumours ( $P=0.018$ ; hazard ratio=0.283; Fig. 5). No dogs with tumours with low TAM counts died during the study. Of dogs with tumours with high TAM counts, the mean survival time from surgery to death was 240 days (range 16–950 days). The mean overall survival of dogs with mammary tumours with low TAM counts was 537 days, while the mean overall survival of dogs with tumours with high TAM counts was 431 days (Table 5).

#### Discussion

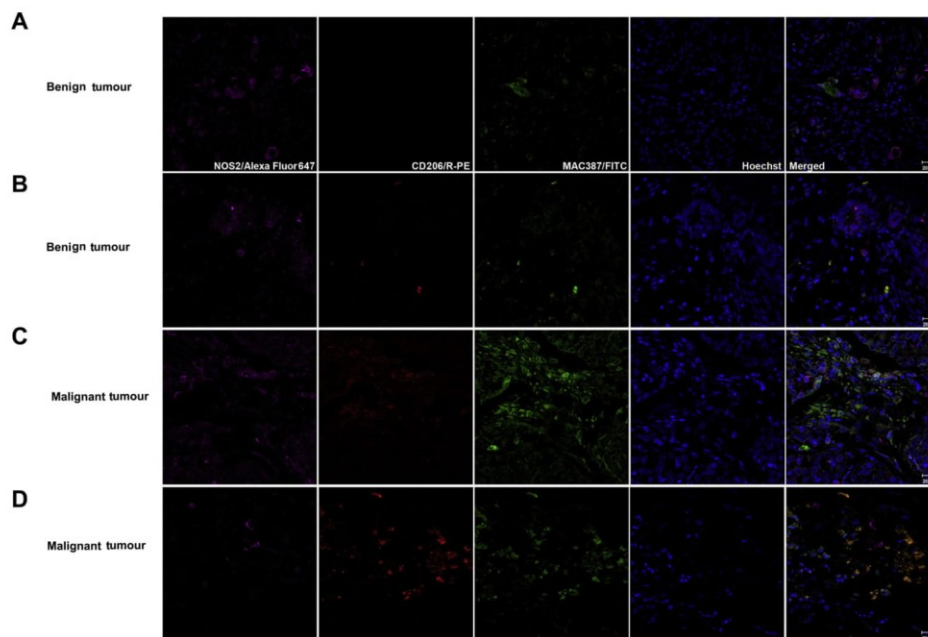
In this study, we examined the role of TAMs in CMTs and the association of TAMs with different histopathological and clinical characteristics of CMTs. In some human tumours, including breast cancer, there is an association between TAMs and neoplastic progression and metastasis (Gwak et al., 2015). However, little information is available for dogs, especially regarding M1/M2 macrophage polarisation. We showed that macrophage counts are

**Table 4**

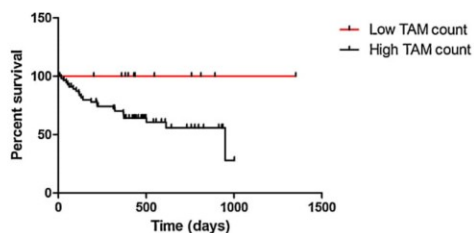
Association between tumour-associated macrophage (TAM) count, positive immunostaining for Ki67, positive immunostaining for epidermal growth factor receptor (EGFR) and microvessel density.

|                          | TAM count  |            | P value            |
|--------------------------|------------|------------|--------------------|
|                          | Low        | High       |                    |
| EGFR score               |            |            | 0.204              |
| 0                        | 0          | 0          |                    |
| +1                       | 11 (13.4%) | 42 (51.2%) |                    |
| +2                       | 2 (2.4%)   | 19 (23.2%) |                    |
| +3                       | 2 (2.4%)   | 6 (7.3%)   |                    |
| Ki67 mean                | 11.8       | 25.2       | 0.009 <sup>*</sup> |
| Microvessel density mean | 90         | 137.1      | 0.008 <sup>*</sup> |

Low  $\leq 50$  TAMs in five high power fields (HPFs); High  $> 50$  in five high power fields.



**Fig. 4.** Confocal immunofluorescence images of canine mammary tumours, showing inducible nitric oxide synthase (NOS2; pink), CD206 (red), MAC387 (green) and Hoechst (blue) overlay images distinguishing between different macrophage phenotypes. (A) Benign tumours with M1-type population (9.5% NOS2+ macrophages; no CD206+ macrophages). (B) Benign tumours showing a shift from M1 to M2 populations (15.9% NOS2+ macrophages; 4.5% CD206+ macrophages). (C) Malignant tumours with a mixed macrophage population (18.6% NOS2+ macrophages; 21.4% CD206+ macrophages). (D) Malignant tumours with a M2 subset pattern (3.4% NOS2+ macrophages; 55.2% CD206+ macrophages). Nuclei were revealed by Hoechst staining (blue) and merged images demonstrate the cytoplasmic localisation of the evaluated proteins. Images are representative of observations from three independent experiments. Bars = 20  $\mu$ m. FITC, fluorescein isothiocyanate; R-PE, R-phycoerythrin.



**Fig. 5.** Kaplan–Meier survival analysis for overall survival based on tumour-associated macrophage (TAM) counts in dogs with mammary cancer (Spearman's log rank test;  $P=0.018$ ).

different between benign and malignant CMTs, increasing in numbers between in situ and invasive carcinomas. Moreover, we demonstrated that benign mammary tumours had low macrophage counts, while malignant mammary tumours had high macrophage counts, as well as polarisation from a predominantly M1 profile to a pattern in which M2 macrophages accumulated within malignant tumours.

TAMs are believed to have different roles according to their location within the tumour microenvironment (areas of invasion versus areas of in situ proliferation); however, no previous studies have addressed the importance of such locations in CMTs. In early stage tumourigenesis, macrophages are visualised at points of basement membrane breakdown during malignant transformation and at the invasive fronts of more advanced tumours (Condeelis and Pollard, 2006). These features suggest that tumours exploit the normal matrix remodelling capacities of macrophages, enabling them to egress into and migrate through the surrounding stroma (Pollard, 2004; Wyckoff et al., 2004; Lin et al., 2006). In our

**Table 5**  
Survival rates according to tumour-associated macrophage (TAM) count in canine mammary tumours.

| TAM count | n (%)      | Mean survival in days | 1 year survival rate | 2 year survival rate | P value             |
|-----------|------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Low       | 11 (15.9%) | 537                   | 100%                 | 100%                 | 0.0177 <sup>*</sup> |
| High      | 58 (84.1%) | 431                   | 100%                 | 72.2%                |                     |

Low  $\leq 50$  TAMs in five high power fields (HPFs); High  $> 50$  in five high power fields.

n = number of dogs.

<sup>\*</sup> P value  $< 0.05$  considered to be statistically significant.

study, fewer TAMs were observed in non-invasive/in situ carcinomatous areas, suggesting that the macrophage count might be lower in initial tumoural phases, including in situ carcinomas. The higher TAM count in malignant tumours tends to support a role for macrophages in mammary cancer cell migration and invasion.

We also observed a relation between tumour subtypes and TAM counts. More aggressive tumours, such as micropapillary carcinomas, solid carcinomas and carcinosarcomas, had higher TAM counts. Such subtypes have a more aggressive behaviour, characterised by a higher invasive and metastatic potential (Cassali et al., 2014). Solid mammary carcinoma was the most frequently diagnosed tumour subtype in which there was a high TAM count. This observation is in accordance with previous findings in human breast cancer, in which increases in TAMs were also detected in more aggressive histological subtypes (Hussein and Hassan, 2006). A higher macrophage count in solid mammary carcinomas was also reported recently in dogs by Raposo et al. (2014).

Malignant breast tumours in human beings and malignant mammary tumours in dogs have higher TAMs than benign tumours (Hussein and Hassan, 2006; Lin et al., 2006; Krol et al., 2012; Raposo et al., 2014). The pattern of TAM infiltration appears to be related to tumour progression. Clinical studies in human beings and in animal models suggest that TAMs are typically polarised within the tumour microenvironment and can adopt a particular phenotype to carry out functions that give support to tumour cell infiltration, motility and vascular invasion (Biswas et al., 2013; Noy and Pollard, 2014). In malignant CMTs, we observed a profile in which CD206 positive macrophages were more abundant, thus indicating a M2-polarised infiltration. NOS2 positive cells were detected in all benign mammary tumours, while CD206 positive cells were detected in less than a half of the evaluated neoplasms, indicating an M1 polarised infiltration. These findings suggest a shift from an M1 pattern in benign tumours to an M2 pattern in malignant tumours, suggesting a protumoural state that promotes CMT progression. A triple staining TAM pattern was observed in some CMTs. The concept of M1 and M2 subpopulations is based on the extremes of a spectrum; macrophages exhibit an M1, M2 or mixed phenotype in response to a range of signals in different microenvironments (Mantovani et al., 2002; Lawrence and Natoli, 2011).

We observed an association between higher TAM counts, higher microvessel density and higher rates of tumour proliferation. Macrophages produce growth factors related to cell proliferation for both neoplastic cells and vascular endothelial cells within the tumour microenvironment. A similar pattern of microvessel density was observed by Raposo et al. (2014), but a relationship with rates of proliferation has not been reported previously (Beirão et al., 2015). There was no statistically significant association between TAMs and EGFR, since all mammary tumours exhibited expression of EGFR.

Higher macrophage counts were also associated with clinical stage and survival in the dogs evaluated on this study. These features reinforce the association between TAM infiltration and worse prognosis, similar to observations in women with breast cancer (Gwak et al., 2015) and in dogs with mammary cancer (Raposo et al., 2014). This highlights the potential role of TAMs as a prognostic indicator in CMTs.

## Conclusions

The results of this study suggest that a higher TAM count is related to CMT invasion and progression and that there is a shift from M1 TAMs in benign CMTs to M2 TAMs in malignant CMTs. Higher TAM counts were associated with higher microvessel density, higher tumour proliferation rates, presence of vascular

invasion and nodal metastasis, as well as overall survival. Future prospective studies with standardised treatment and outcome measurements should be conducted to evaluate the potential role of TAMs as an independent prognostic indicator in CMTs.

## Conflict of interest statement

None of the authors has any financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG research grant APQ-01951-15), the Espírito Santo Research Foundation (FAPES research grant PPP-102/2017), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES PhD grant) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq research grant 477386/2014-2) of Brazil for financial support. Confocal laser microscopy data shown in this study was obtained at the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG, Belo Horizonte, Brazil). The authors also wish to thank Dr Renée Amorim for the anti-macrophage antibody, and Tatiany Silveira, Diego Carlos dos Reis and Fernanda Nunes for technical assistance.

## References

- Beirão, B.C.B., Raposo, T., Pang, L.Y., Argyle, D.J., 2015. Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. *BMC Veterinary Research* 11, 1–14.
- Biswas, S.K., Allavena, P., Mantovani, A., 2013. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology* 35, 585–600.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., de Nardi, A.B., Ghever, C., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Oliveira, L.O., Sueiro, F.A.R., et al., 2014. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 7, 153–180.
- Condeelis, J., Pollard, J.W., 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263–266.
- De Nardo, D.G., Coussens, L.M., 2007. Inflammation and breast cancer: balancing immune response crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 9, 1–10.
- Gwak, J.M., Jang, M.H., Kim, D.I., Seo, A.N., Park, S.Y., 2015. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic location and hormone receptor status in breast cancer. *PLoS One* 10, 1–14.
- Hussein, M.R., Hassan, H.I., 2006. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *Journal of Clinical Pathology* 59, 972–977.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A., 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology* 133, 246–252.
- Krol, M., Pawlowski, K.M., Majchrzak, K., Gajewska, M., Majewska, A., Motyl, T., 2012. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro. *BMC Veterinary Research* 8, 1–20.
- Lawrence, T., Natoli, G., 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology* 11, 750–761.
- Lin, E.Y., Li, J.F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X.N., Pollard, J.W., 2006. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Research* 66, 11238–11246.
- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmén, E., Lipscomb, T.P., 1999. *Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*. World Health Organization International Classification of Tumours of Domestic Animals, 2nd Series, Vol. VII. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology and WHO Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington, DC, USA 58 pp.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23, 549–555.
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* 11, 723–737.
- Noy, R., Pollard, J.W., 2014. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41, 49–61.

- Owen, L.M., 1980. TNM Classification of Tumours in Domestic Animals. World Health Organization, Geneva, Switzerland 53 pp.
- Pollard, J.W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 4, 71–78.
- Qian, B.Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.
- Raposo, T., Gregório, H., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., 2014. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology* 12, 10–19.
- Raposo, T.P., Pires, I., Carvalho, M.I., Prada, J., Argyle, D.J., Queiroga, F.L., 2015. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Veterinary Comparative Oncology* 13, 464–474.
- Ricklin, M.E., Roosje, P., Summerfield, A., 2010. Characterization of canine dendritic cells in healthy, atopic, and non-allergic inflamed skin. *Journal of Clinical Immunology* 30, 845–854.
- Rodrigues, M.A., Gamba, C.O., Faria, J.A., Ferreira, Ê., Goes, A.M., Gomes, D.A., Cassali, C.D., 2016. Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. *Pathology Research and Practice* 212, 340–344.
- Sanches, F.P., Tomokane, T.Y., Da Matta, V.L., Marcondes, M., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., 2014. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. *Acta Veterinaria Scandinavica* 7, 56–57.
- Santos, A.A., Lopes, C.C., Ribeiro, J.R., Martins, L.R., Santos, J.C., Amorim, I.F., Gärtner, F., Matos, A.J., 2013. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Veterinary Research* 9, 1.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt, M.H., 2011. Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., Vail, D.M., Rodney, L.P. (Eds.), *Small Animal Clinical Oncology*. 5th Ed. Saunders Elsevier, St Louis, MO, USA, pp. 538–556.
- Tuominen, W.J., Ruotoistenmäki, S., Viitanen, A., Jumppanen, M., Isoä, J., 2010. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research* 12, R56.
- Weidner, N., 2008. Measuring intratumoral microvessel density. *Methods in Enzymology* 444, 305–323.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., Condeelis, J., 2004. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Research* 64, 7022–7029.



**ARTIGO 2****Prognostic value of tumour-associated macrophages microlocalization in canine  
mammary carcinomas**

Submetido para publicação no periódico *Biomarkeres*, 2018.

## Biomarkers



**Prognostic value of tumour-associated macrophages  
microlocalization in canine mammary carcinomas**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | Biomarkers  |
| Manuscript ID:                | Draft   |
| Manuscript Type:              | Original paper  |
| Date Submitted by the Author: | n/a   |
| Complete List of Authors:     | Monteiro, Lidiane; Universidade Federal de Minas Gerais<br>Salgado, Breno; Universidade Federal do Espírito Santo<br>Cassali, Geovanni; Universidade Federal de Minas Gerais. Patologia Geral |
| Keywords:                     | Breast cancer, Growth factors/cytokines/inflammatory mediators,<br>Proteomics   |

SCHOLARONE<sup>™</sup>  
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/tbmk> Email: [office-biomarkers@charite.de](mailto:office-biomarkers@charite.de)

**Prognostic value of tumour-associated macrophages microlocalization in canine mammary carcinomas**

Lidianne Narducci Monteiro<sup>1</sup>, Breno Souza Salgado<sup>2</sup>, Geovanni Dantas Cassali<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Patologia Geral, Laboratório de Patologia Comparada (LPC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. 6627 Antonio Carlos Av, ZIP Code: 31270-901. Telephone: +55 31 3409 2891. e-mail: lidinarducci@hotmail.com*

<sup>2</sup> *Departamento de Patologia, Laboratório de Patologia Animal e Comparada (LPA), Laboratório de Imunopatologia (Life), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), Vitória, Brazil. Marechal Campos Av 1468, ZIP Code 29043-090. Telephone: +55 27 3335-7290. e-mail: breno.salgado@ufes.br. ORCID:0000-0003-3251-6506.*

<sup>3</sup> *Departamento de Patologia Geral, Laboratório de Patologia Comparada (LPC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. 6627 Antonio Carlos Av, ZIP Code: 31270-901. Telephone: +55 31 3409 2891. e-mail: cassalig@icb.ufmg.br. ORCID: 0000-0002-5650-6743.*

Corresponding author: Geovanni Dantas Cassali.

## **Prognostic value of tumour-associated macrophages microlocalization in canine mammary carcinomas**

In this study we evaluated the potential role of tumour-associated macrophages (TAM) in specific histologic locations – intraepithelial (iTAM) and stromal (sTAM), as well as total macrophage (tTAM) counts – as prognostic indicators in canine mammary tumours. Clinico-pathologic data from 66 animals with mammary carcinoma and their tumours were used in this study. Samples were stained with anti-macrophage antibodies for subsequent TAM count. High levels of iTAM, sTAM, and tTAM were related with clinical stage and vascular invasion. Additionally, tTAM alone revealed a relation with tumour size, while high levels of sTAM and tTAM also were correlated with node metastasis and a poor prognosis based on survival analysis. Canine mammary tumours with aggressive features can reveal higher TAM counts. TAM counts are related with vascular invasion and nodal metastasis, and total TAM, but not stromal or intraepithelial TAM, are associated with overall survival, consequently leading to the conclusion that the tTAM can be used as prognostic indicators in canine mammary invasive carcinomas.

**Keywords:** Breast cancer; growth factors/cytokines/inflammatory mediators; proteomics;

### **Funding details**

This work was supported by Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) under grant APQ-01951-15; Espírito Santo Research Foundation (FAPES) under grant PPP 102/2017; and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grant 477386/2014-2.

## **Background**

Mammary cancer is frequent in female dogs and represents an important issue in veterinary medicine because many animals die due to tumour dissemination. Previous studies have addressed infiltration by leukocytes in canine mammary tumours' microenvironment and evaluated mostly lymphocytes (Estrela-Lima et al., 2010) and macrophages (Raposo et al., 2014, 2015); however, more extensive data regarding tumour-associated leukocytes in such neoplasms is still lacking.

Macrophages represent a major component in the tumour microenvironment. They infiltrate tumour tissues and are thought to be related with tumour progression in human (Ohno et al., 2002, Solinas et al., 2009, Mahmoud et al., 2012, Medrek et al., 2012, Ch'ng et al., 2013, Gwak et al., 2015) and canine cancers (Raposo et al., 2014, 2015). Although the original hypotheses proposed that macrophages were involved in antitumour immunity, there is substantial clinical and experimental evidence that in most of cases they enhance tumour evolution to malignancy (Bingle et al., 2002). They are called tumour-associated macrophages (TAM) and have been associated with angiogenesis and tissue remodelling within tumours, thus helping in metastasis (Bingle et al., 2002, Condeelis and Pollard, 2006, Solinas et al., 2009, Pollard, 2014). High macrophage infiltration has been recently correlated with poor prognosis in both human (Mahmoud et al., 2012, Medrek et al., 2012, Ch'ng et al., 2013, Gwak et al., 2015) and canine (Raposo et al., 2014, 2015) patients with mammary tumours. Results indicated that highly infiltrated tumours have a poor prognosis. However, the prognostic importance of TAM specific locations (microlocalization) in such tumours was not evaluated to date. The study of new biomarkers is highly encouraged also in veterinary medicine (Eckersall et al., 2009) and this study aimed to address the significance of TAM infiltration in different histologic compartments (intraepithelial vs. stromal vs. total) of invasive canine mammary carcinomas and its relation with tumours' clinicopathologic features. Thus, the TAM data obtained from the tumours could be useful to assess the outcomes of canine mammary cancer patients.

## **Materials and Methods**

### **Patients, samples and clinical data**

This study was in accordance with the ethical standards of the Institutional Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (protocol #

81-2013).

Sixty-six female dogs diagnosed with mammary carcinomas from 2011 to 2015 were used in this study. All patients were submitted to surgical mastectomy as treatment option with subsequent microscopic evaluation of the excised mammary tumours. They were classified according to the World Health Organization's (WHO) histologic criteria for canine mammary tumours diagnosis (Misdorp et al., 1999) and to updated classification propositions (Cassali et al., 2014). Subsequently, tumours were graded using the Nottingham grading system (Karayannopoulou et al., 2005). When dogs presented more than one malignant neoplasm, the tumour with the more aggressive clinical and histopathologic features (e.g., larger size, undifferentiated histology) was selected, as recommended by other authors (Sorenmo et al., 2013). The WHO's staging system (Owen, 1980) was used for clinical stage determination based on animals' clinical, radiographic, and sonographic findings.

Patients' data were obtained by phone interviews with owners and by reviewing the clinical data available at the Institution's Veterinary Teaching Hospital. Overall survival (OS) was calculated and characterized as the time from surgery/tumour removal to the date of patient death/euthanasia due to tumour-related causes and/or end of the study. Data was censored when owners did not answer or when animals died from other causes.

### ***Immunohistochemistry***

For immunohistochemistry, 3 $\mu$ m-thick sections were obtained from paraffin blocks and mounted on poly-L-lysine-coated slides. Sections were deparaffinized and rehydrated and subsequently submitted to heat-induced epitope/antigen retrieval for 30 seconds at 125°C using the Trilogy antigen retrieval buffer (Cell Marque Corporation, Rocklin, CA) in a pressure chamber (Pascal Pressure Chamber, Dako, Carpinteria, CA). Proteinase K antigen retrieval was used when suitable, with subsequent incubation of tissue sections with a mouse anti-macrophage antibody (clone MAC387, 1:400, AbD Serotec, Oxford, UK). Canine lymph node tissue was used as positive control for reactions while negative controls were obtained by using isotype-matched primary antibodies. For anti-macrophage immunohistochemistry, the staining was revealed by using a polymer based detection system (Envision G2 System/AP, rabbit/mouse, Dako) with liquid permanent red as chromogen (Permanent red substrate-chromogen, Dako) and

visualized under light microscopy. For the other antibodies used, the antigen-antibody reaction was revealed by using 3-3' diaminobenzidine (DAB) as chromogen.

### ***Immunolabelling and quantification of tumour-associated macrophages***

Immunoreaction was considered as positive for anti-macrophage antibodies when cytoplasmic diffuse or granular staining (but no nuclear) was observed and simultaneously demonstrating macrophage morphology. Since the antibody also stains granulocytic cells, macrophages were distinguished from other cells, such as neutrophils by nuclear morphologic (non-segmented nuclei). The number of stained TAM was counted in each tumour in five hot spot areas first detected at low magnification and then captured at x200 magnification (total area of 1 mm<sup>2</sup>) without any previous knowledge of patients' clinical data. TAM hot spots were chosen rather than random fields, because these areas are thought to be biologically the most important (Leek et al., 1996, Takeuchi et al., 2004). For cut-off point analysis, the medians were used to categorize tumours into high and low TAM groups.

In order to distinguish intratumoural (i.e., intraepithelial) and stromal TAM, criteria previously applied by other authors (Gwak et al., 2015) and based on differentiation of stromal from intraepithelial lymphocytes (Derkert et al., 2010, Seo et al., 2013) were used. Intratumoural TAM (figure 1) were defined as macrophages within tumour cell nests in direct contact with tumour cells, and stromal TAM were characterized as macrophages infiltrating tumour stroma. After counting, the number of intraepithelial, stromal, and total TAM (sum of both types) was calculated. Median values were calculated for each histologic location and used for categorization of tumours as with low or high TAM infiltration.

### ***Statistical analysis***

TAM infiltration was compared using analysis of variance (ANOVA) with TAM value as a continuous variable. Correlation between the number of macrophages and clinicopathologic features was assessed using Spearman rank order correlation or the Mann-Whitney U test, which was used for comparison between different histologic locations. Survival curves were produced using the Kaplan-Meier method and differences in survival time between patients were evaluated using the log-rank test. Results were considered as statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

### *Clinical and histological features*

The mean age of the subjects was twelve years (range, four to twenty years). After histopathologic evaluation, tumours were classified as carcinomas in mixed tumours (26 cases/39.39%), papillary carcinomas (11 cases/16.66%), solid carcinomas (10 cases/15.15%), micropapillary carcinomas (7 cases/10.60%), and tubular carcinomas and carcinosarcomas (6 cases each/9.09% each). From all tumours, 13 cases (19.69%) were high grade (grade 3), whereas 20 (30.30%) and 33 cases (50%) were of grades 1 and 2, respectively. Twenty-two samples (33.33%) presented with vascular invasion, 29 (43.93%) cases revealed evidence of nodal metastasis, and 2 cases presented with distant metastasis (3.03%). Clinicopathologic data are summarized in table 1.

### *Macrophage count and clinicopathologic features*

Macrophages showed moderate to intense cytoplasmic staining and were observed as single or clustered cells forming densely packed groups. The distribution of TAM in CMT was rather heterogeneous and frequently observed at the stroma of the tumour front, around necrotic areas of the tumour, associated with areas of cartilage and bone production in mixed tumours, and within tumour nests (intraepithelial). All tumour histotypes revealed macrophage positivity. The highest tTAM count was of 1282/mm<sup>2</sup> (1219 sTAM/mm<sup>2</sup>; 63 iTAM/mm<sup>2</sup>) in a papillary carcinoma. Median TAM counts/mm<sup>2</sup> were used as cut-off values for iTAM, sTAM, and tTAM in order to categorize them as of low or high TAM infiltration (iTAM:  $\leq 61.5$ ,  $> 61.5$ ; sTAM:  $\leq 57.5$ ,  $> 57.5$ ; tTAM: low  $\leq 149$ ,  $> 149$ , figure 2).

All TAM counts (iTAM, sTAM, and tTAM) revealed a correlation with clinical stage ( $P = 0.0380$ ,  $0.0162$ , and  $0.0004$ , respectively; table 1) and vascular invasion ( $P = 0.0235$ ,  $0.0371$ , and  $0.0371$ , respectively; table 1). The tTAM count also correlated with tumour size ( $P = 0.0017$ ; table 1), while sTAM and tTAM revealed a relation with lymph node metastasis ( $P = 0.0256$ ; table 1). No associations were observed between TAM and ulceration, necrosis, histologic grade, or distant metastasis.

### *Survival analysis and TAM counts*

To assess the prognostic significance of TAM infiltration, patients were first



classified according to iTAM, sTAM, and tTAM counts. Survival data were available for the 66 animals. A significant relationship between TAM infiltration and overall survival was revealed for tTAM ( $P = 0.0282$ ; figure 3A), but not for sTAM ( $P = 0.0504$ ; figure 3B) or iTAM ( $P = 0.8439$ ; figure 3C). Median overall survival of dogs with mammary tumours with high TAM counts was of 950 days (table 2). The curve did reach the median survival time in cases with low sTAM and tTAM at 613 days.

## Discussion

Mammary tumours are the most common neoplasms in non-spayed adult female dogs (Misdorp et al., 1999, Cassali et al., 2014). Since they can be extremely aggressive and lead to death of animals and because of the large number of cellular events involved in cell growth, differentiation, proliferation, invasion and metastasis, the investigation of TAM may be a great relevance for the understanding of CMT progression. Therefore, in this study we addressed the role of TAM in CMT progression and the importance of TAM in specific locations in such tumours. In humans, there is strong evidence of TAM association with neoplastic progression and metastasis in different tumour types (Bingle et al., 2002), including breast cancer (Mahmoud et al., 2012, Medrek et al., 2012, Gwak et al., 2015). This feature was also recently described in dogs with mammary cancer (Raposo et al., 2014, 2015).

TAM have a diverse role according to their microenvironment and histologic microlocalization (Ohno et al., 2002, Mahmoud et al., 2012, Medrek et al., 2012, Ch'ng et al., 2013, Gwak et al., 2015), but still little information is available for dogs, with lack of data regarding the specific location of such cells within tumours. In this study, high levels of TAM infiltration were associated with aggressive clinicopathologic features in canine mammary carcinomas. Additionally, total TAM counts were related with lymph node metastasis and with a poor prognosis given their influence on overall survival, in a similar way to what is observed in women (Mahmoud et al., 2012, Medrek et al., 2012, Gwak et al., 2015). However, we did not observe an effect of stromal and intraepithelial TAM in overall survival. Despite the well known role of various leukocytes in tumour microenvironment functional state (Pollard, 2008), this feature was not unexpected because macrophages are highly motile and can cross between tissues microlocalizations freely.

In previous studies, necrosis and skin ulceration have also been suggested to be

indicators of higher tumour aggressiveness in dogs (Hellmén et al., 1993), but were not significantly associated with TAM counts in this study. The absence of a significant association between TAM and necrotic tissue or ulceration could be explained by the method used to count macrophages, in which counting was focused in hot spots within tumour stroma and tumour nests (intraepithelial area). However, a relation between a higher TAM counts (iTAM, sTAM, and tTAM) and clinical stage and vascular invasion was found – while tTAM was also related with tumour size – similarly to what was observed by other authors (Krol et al., 2012, Raposo et al., 2015). Additionally, tTAM was associated with lymph node metastasis – an expected feature given the ability of macrophages in remodelling tumour stroma and acting as a major player in the enhancement of tumour cell migration and invasion (Lewis et al., 2006). These features are highly important for metastasis, reinforcing the role of macrophages in canine mammary carcinoma progression. Despite this, we did not observe a relation between TAM counts and histologic grade, in concordance with other authors' reports (Krol et al., 2012, Raposo et al., 2014, 2015). This finding could indicate that macrophage infiltration can be associated with other tumour features independent from its histologic grade.

In this study, higher tTAM counts were also correlated with survival and prognosis, in concordance with other authors results (Raposo et al., 2014). The relation between the evaluated clinicopathologic data and higher TAM counts indicate a relation with a worse prognosis and survival rate, similarly to what is observed in women with breast cancer (Leek et al., 1996, Gwak et al., 2015), consequently highlighting the potential role of tTAM count as prognostic indicators in canine invasive mammary carcinomas.

In summary, it is possible to conclude that canine mammary tumours with aggressive features can reveal higher TAM counts. TAM are associated with vascular invasion and nodal metastasis, and tTAM counts – but not sTAM or iTAM, are correlated with overall survival, consequently leading to the conclusion that sTAM and/or tTAM counts could be used as prognostic indicators in canine mammary invasive carcinomas.

### **Disclosure of interest**

The authors report no conflict of interest.

## References

- Bingle, L., Brown, N.J., Lewis, C.E., 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies, *J Pathol*, 196, 254–265.
- Cassali, G.D., Lavalle, G.E., Ferreira, E., Estrela-Lima, A., de Nardi, A.B., Ghever, C., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Oliveira, L.O., Sueiro, F.A.R., et al., 2014, Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors, *Braz J Vet Pathol*, 7, 153-180.
- Ch'ng, E.S., Tuan Sharif, S.E., Jaafar, H., 2013. In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters nad tumor angiogenesis, *Virchow Arch*, 462, 257-267.
- Condeelis, J., Pollard, J.W., 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis, *Cell*, 124, 263–266.
- Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenewtt, R., Hanusch, C., von Törne, C., Weichert, W., Engels, K., Solbach, C., Schrader, I., Dietel, M., von Minckwitz, G., 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, *J Clin Oncol*, 28, 105-113.
- Eckersall, P.D., Slater, K., Mobasher, A., 2009. Biomarkers in veterinary medicine: establishing a new international forum for veterinary biomarker research. *Biomarkers*, 14, 637-641.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S.M., Cardoso, S.V., Martins-Filho, O.A., Serakides, R., Cassali, G.D., 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.
- Gwak, J.M., Jang, M.H., Kim, D.I., Seo, A.N., Park, S.Y., 2015. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic location and hormone receptor status in breast cancer, *PLoS ONE*, 10, 1-14.

Hellmén, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I.B., Hansson, K., Lindgren, A., 1993. Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases, *Vet Pathol*, 30, 20–27.

Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A., 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method, *J Comp Pathol*, 133, 246-252.

Krol, M., Pawlowski, K.M., Majchrzak, K., Gajewska, M., Majewska, A., Motyl, T., 2012. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro, *BMC Vet Res*, 8, 1-20.

Leek, R.D., Lewis, C.E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., Harris, A.L., 1996. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma, *Cancer Res*, 56, 4625-4629.

Lewis, C.E., Pollard, J.W., 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments, *Cancer Res*, 66, 605-612.

Mahmoud, S.M.A., Lee, A.H.S., Paish, E.C., Macmillan, R.D., Ellis, I.O., Green, A.R., 2012, Tumour infiltrating macrophages and clinical outcomes in breast cancer, *J Clin Pathol*, 65, 159-163.

Medrek, C., Ponten, F., Jirstom, K., Leandersson, K., 2012. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients, *BMC Cancer*, 12, 306.

Misdorp, W., Else, R., Hellmen, E., Lipscomb, T.P., 1999. *Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat*, 2<sup>nd</sup> series, Washington: Armed Forces Institute of Pathology.

Ohno, S., Inagawa, H., Soma, G., Nagasue, N., 2002, Role of tumor-associated macrophage in malignant tumors: should the location of the infiltrated macrophages be taken in account during evaluation, *Anticancer Res*, 22, 4269-4275.

Owen, L.N., 1980. *TNM classification of tumors in domestic animals*. Geneva: World Health Organization.

Pollard, J.W., 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, *Nat Rev Cancer*, 4, 71–78.

Pollard, J.W., 2008. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*, 84, 623-630.

Qian, B.Z., Pollard, J.W., 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis, *Cell*, 141, 39-51.

Raposo, T., Gregório, H., Pires, I., Prada, J., Queiroga, F.L., 2014. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours, *Vet Comp Oncol*, 12, 10-19.

Raposo, T., Pires, I., Carvalho, M.I., Prada, J., Argyle, D.J., Queiroga, F.L., 2015. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours, *Vet Comp Oncol*, 13, 464-474.

Seo, A.N., Lee, H.J., Kim, E.J., Kim, H.J., Jang, M.H., Lee, H.E., Kim, Y.J., Kim, J.H., Park, S.Y., 2013. Tumour-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer, *Br J Cancer*, 109, 2705-2713.

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P., 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation, *J Leukocyte Biol*, 86, 1065-1073.

Sorenmo, K.U., Worley, D.R., Goldschmidt, M.H., 2013. Tumors of the mammary gland. *In: Withrow, S.J., Vail, D.M. and Rodney, L.P., eds. Small Animal Clinical Oncology. 5<sup>th</sup> ed. St. Louis, Elsevier Saunders, 538-556.*

Takeuchi, T., Hisanaga, M., Nagao, M., Ikeda, N., Fujii, F., Mukogawa, T., Matsumoto, H., Kondo, S., Takahashi, C., Noda, M., Nakajima, Y., 2004. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, 10, 5572-5579.

## List of tables

Table 1. Association between TAM counts according to histologic location and clinicopathologic features

| Clinicopathologic characteristic | Intraepithelial TAM |               | P value | Stromal TAM   |               | P value | Total TAM     |               | P value |   |
|----------------------------------|---------------------|---------------|---------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|---------|---|
|                                  | Low N (%)           | High N (%)    |         | Low N (%)     | High N (%)    |         | Low N (%)     | High N (%)    |         |   |
| <i>Size</i>                      |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| T1 (<3cm)                        | 15<br>(22.72)       | 9<br>(13.63)  | 0.0891  | 15<br>(22.72) | 9<br>(13.63)  | 0.1761  | 17<br>(25.75) | 7<br>(10.60)  | 0.0017  |   |
| T2 (3-5cm)                       | 8<br>(12.12)        | 6 (9.09)      |         | 7<br>(10.60)  | 7<br>(10.60)  |         | 8<br>(12.12)  | 6 (9.09)      |         | * |
| T3 (>5cm)                        | 11<br>(16.66)       | 17<br>(25.75) |         | 11<br>(16.66) | 17<br>(25.75) |         | 8<br>(12.12)  | 20<br>(30.30) |         |   |
| <i>Nodal metastasis</i>          |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| Yes                              | 12<br>(18.18)       | 17<br>(25.75) | 0.1491  | 10<br>(15.15) | 19<br>(28.78) | 0.0256  | 10<br>(15.15) | 19<br>(28.78) | 0.0256  |   |
| No                               | 22<br>(33.33)       | 15<br>(22.72) |         | 23<br>(34.84) | 14<br>(21.21) |         | 23<br>(34.84) | 14<br>(21.21) |         | * |
| <i>Distant metastasis</i>        |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| Yes                              | 25<br>(37.87)       | 29<br>(43.93) | 0.1492  | 33<br>(50.0)  | 31<br>(46.96) | 0.9827  | 34<br>(51.51) | 30<br>(45.45) | 0.1621  |   |
| No                               | 0<br>(0)            | 2 (3.03)      |         | 1 (1.51)      | 1 (1.51)      |         | 0<br>(0)      | 2 (3.03)      |         |   |
| <i>Clinical stage</i>            |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| I                                | 14<br>(21.21)       | 7<br>(10.60)  | 0.0380  | 14<br>(21.21) | 7<br>(10.60)  | 0.0162  | 17<br>(25.75) | 4 (6.06)      | 0.0004  |   |
| II                               | 2 (3.03)            | 1 (1.51)      |         | 2 (3.03)      | 1 (1.51)      |         | 2 (3.03)      | 1 (1.51)      |         |   |
| III                              | 7<br>(10.61)        | 6 (9.1)       |         | 8<br>(12.12)  | 5 (7.57)      |         | 5 (7.57)      | 8<br>(12.12)  |         | * |
| IV                               | 10<br>(15.15)       | 17<br>(25.75) |         | 7<br>(10.60)  | 20<br>(30.30) |         | 8<br>(12.12)  | 19<br>(28.78) |         |   |
| IV                               | 0<br>(0)            | 2 (3.03)      |         | 1 (1.51)      | 1 (1.51)      |         | 0<br>(0)      | 2 (3.03)      |         |   |
| <i>Ulceration</i>                |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| Yes                              | 28<br>(42.42)       | 28<br>(42.42) | 0.8367  | 27<br>(40.9)  | 29<br>(43.93) | 0.0371  | 27<br>(40.9)  | 30<br>(45.45) | 0.6883  |   |
| No                               | 6<br>(9.1)          | 4 (6.06)      |         | 6<br>(9.1)    | 4 (6.06)      |         | 4 (6.06)      | 5 (7.57)      |         |   |
| <i>Necrosis</i>                  |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| Yes                              | 21<br>(31.81)       | 20<br>(30.30) | 0.5761  | 20<br>(30.30) | 21<br>(31.81) | 0.8034  | 18<br>(27.27) | 23<br>(34.84) | 0.2105  |   |
| No                               | 12<br>(18.18)       | 13<br>(19.69) |         | 14<br>(21.21) | 11<br>(16.66) |         | 15<br>(22.72) | 10<br>(15.15) |         |   |
| <i>Histological grade</i>        |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| I                                | 11<br>(16.66)       | 9<br>(13.63)  | 0.6677  | 12<br>(18.18) | 8<br>(12.12)  | 0.1229  | 12<br>(18.18) | 8<br>(12.12)  | 0.1229  |   |
| II                               | 19<br>(28.78)       | 14<br>(21.21) |         | 16<br>(24.24) | 17<br>(25.75) |         | 17<br>(25.75) | 16<br>(24.24) |         |   |
| III                              | 5 (7.57)            | 8<br>(12.12)  |         | 4 (6.06)      | 9<br>(13.63)  |         | 4 (6.06)      | 9<br>(13.63)  |         |   |
| <i>Vascular invasion</i>         |                     |               |         |               |               |         |               |               |         |   |
| Yes                              | 7                   | 15            | 0.0235  | 7             | 15            | 0.0371  | 7             | 15            | 0.0371  |   |

|    |         |         |         |         |         |         |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|    | (10.60) | (22.72) | (10.60) | (22.72) | (10.60) | (22.72) |
| No | 27      | 17      | 26      | 18      | 26      | 18      |
|    | (41.0)  | (25.75) | (39.39) | (27.27) | (39.39) | (27.27) |

\*  $P$  value  $< 0.05$  was considered to be statistically significant.

Table 2. Survival rates according to TAM count and histologic location in canine mammary tumours

| TAM count                               | N (%)      | Median    | Mean   | P value |
|---|------------|-----------|--------|---------|
| <i>Intraepithelial</i> <sup>&amp;</sup> |            |           |        |         |
| Low                                     | 30 (49.18) | Undefined | 451.56 | 0.8439  |
| High                                    | 31 (50.82) | 950       | 437.06 |         |
| <i>Stromal</i> <sup>\$</sup>            |            |           |        |         |
| Low                                     | 29 (47.54) | 613       | 482.93 | 0.0504  |
| High                                    | 32 (52.46) | 950       | 409.09 |         |
| <i>Total</i> <sup>#</sup>               |            |           |        |         |
| Low                                     | 22 (36.07) | 613       | 489.5  | 0.0282* |
| High                                    | 39 (63.93) | 950       | 418.6  |         |

& Low:  $\leq 61.5$ ; High:  $> 61.5$

\$ Low:  $\leq 57.5$ ; High:  $> 57.5$

# Low:  $\leq 149$ ; High:  $> 149$ .

\*  $P$  value  $< 0.05$  was considered to be statistically significant.

## List of figure legends

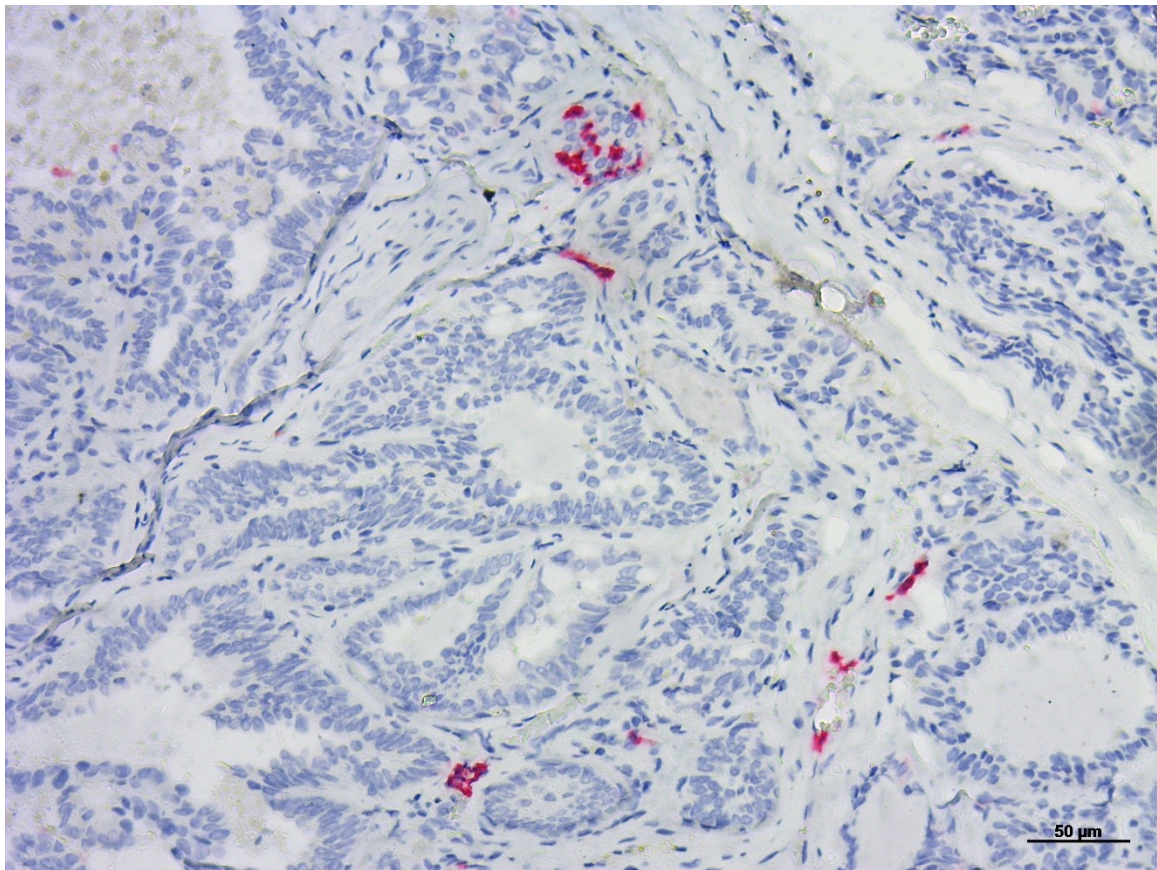


Figure 1. Canine mammary carcinoma. Infiltrating macrophages can be observed as intraepithelial and stromal TAM. Permanent red immunohistochemistry, Harris haematoxylin counterstain (bar = 50  $\mu$ m).



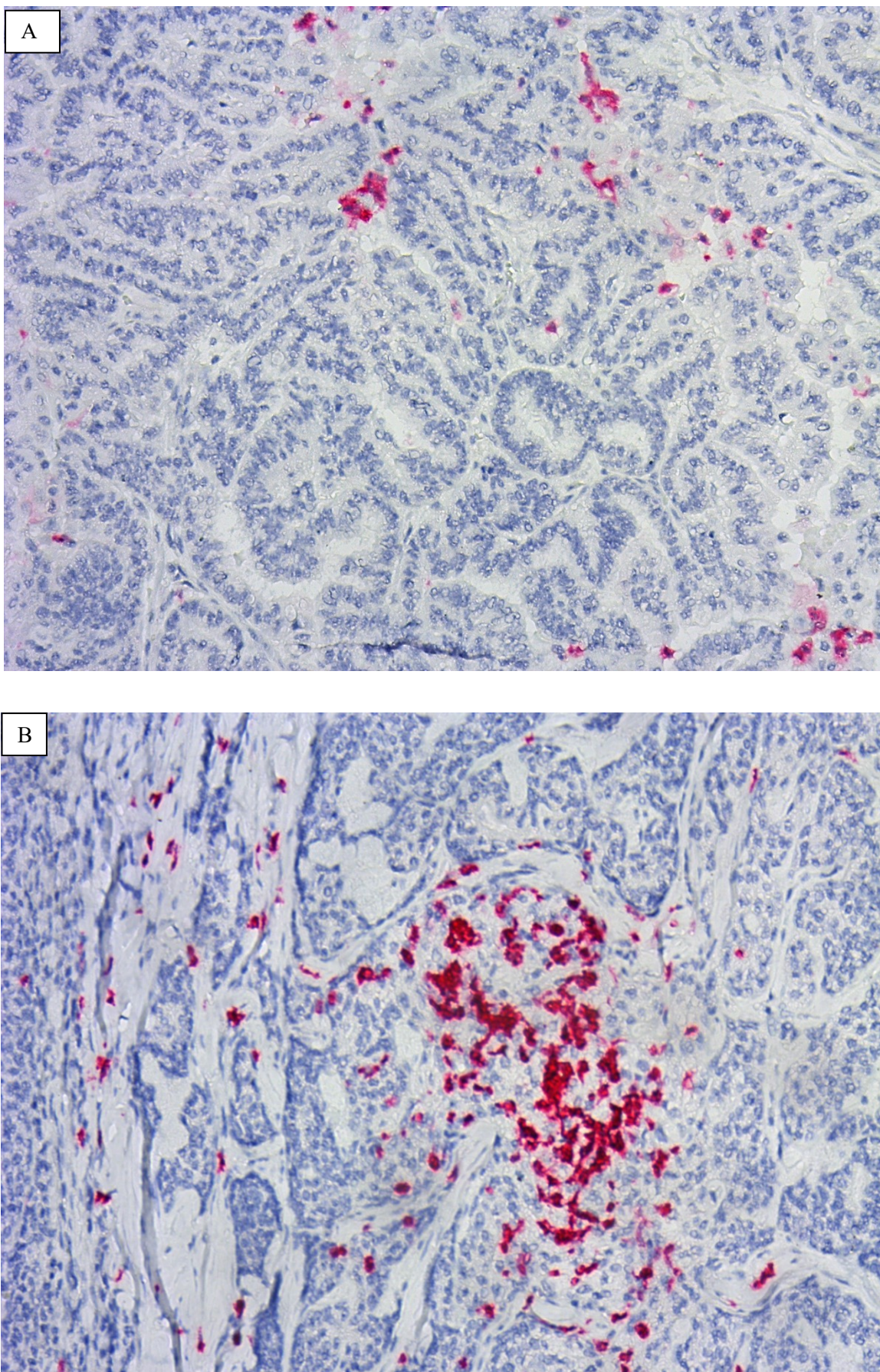
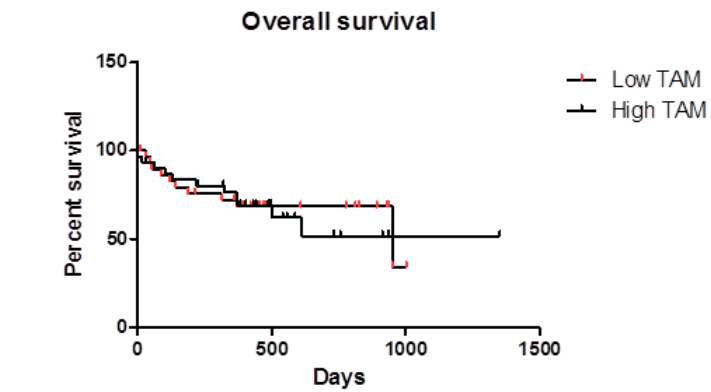
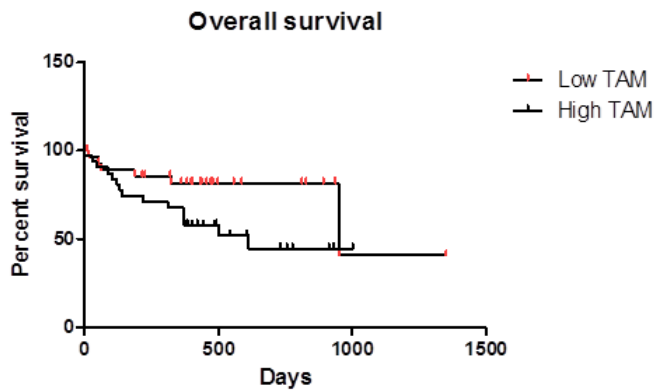


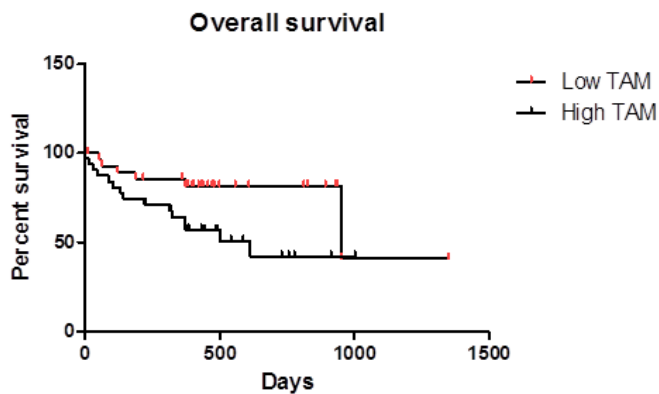
Figure 2. Canine mammary carcinomas with low (A) and high (B) TAM infiltration. Permanent red immunohistochemistry. Harris haematoxylin counterstain (x20 objective).



A)



B)



C)

Figure 3. Kaplan–Meier survival analysis for OS based on low and high TAM counts in dogs with mammary carcinomas. A) Intraepithelial TAM (log rank test,  $P = 0.8439$ ); B) Stromal TAM (log rank test,  $P = 0.0500$ ); C) Total TAM (log rank test,  $P = 0.0282$ ).

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- Nossos resultados indicam que contagem de MAT nas neoplasias mamárias em cadelas está relacionada à progressão neoplásica, invasividade e potencial metastático, e conseqüentemente com a sobrevida dos pacientes.
- Em geral, a maior densidade de MAT está relacionada ao tamanho das neoplasias, metástase nodal, estadió clínico e invasão vascular.
- Observamos diferença entre a densidade de MAT e o tipo histológico das neoplasias mamárias, com maiores contagens observadas nos carcinomas em tumores mistos e carcinomas sólidos.
- Observamos associação entre altas contagens totais com um perfil carcinomatoso invasor, fato não observado para um perfil não-invasor/*in situ*.
- Quando avaliamos a contagem de MAT de acordo com a localização histológica no tumor, maiores densidades de macrófagos se mostraram associadas com estadió clínico e invasão vascular, apresentando também associação com tamanho quando avaliadas MATt e com a ocorrência de metástase nodal quando presente no estroma e na contagem total.
- Os MAT também se mostraram associados com o histotipos e as taxas de proliferação celular e densidade microvascular nos tumores, tendo tais contagens relação com um pior prognóstico à análise da sobrevida dos animais.
- Observamos maior expressão de CD206 nos tumores com altas contagens de MAT e nos tumores benignos, com menores contagens de MAT, observamos maior imunexpressão de NOS2, indicando possíveis diferenças nos fenótipos M1 e M2 entre tumores benignos e malignos.
- Nas avaliações em tripla marcação, observamos um padrão misto M1/M2, evidenciando áreas transitórias de polarização dos macrófagos nos fenótipos M1 e M2.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas atuais cada vez mais evidenciam a importância da resposta imunitária no desenvolvimento de neoplasias, com ênfase principalmente no recrutamento de monócitos para o sítio neoplásico. As células neoplásicas podem ser revertidas para um estado diferenciado quando incorporadas a um microambiente diferenciado. Observamos que o microambiente é em grande parte, responsável pelas características malignas de uma neoplasia. Assim, para que os tumores evoluam e se tornem malignos, eles devem manipular seu microambiente de forma a favorecer sua progressão. E dentre essas mudanças, o recrutamento de células derivadas da medula óssea - em especial os macrófagos - são decisivas para que ocorram essas alterações.

Os resultados obtidos neste trabalho sinalizam a importante correlação entre a presença de macrófagos associados ao tumor e a progressão tumoral. Nossos resultados confirmaram que a contagem de MAT nas neoplasias mamárias em cadelas, assim como no câncer de mama da mulher e estudos experimentais, está relacionada à progressão neoplásica, invasividade e potencial metastático, e conseqüentemente com a sobrevivência dos pacientes. Esses resultados abrem precedentes para que novas pesquisas nessa linha possam ser realizadas no intuito de entender melhor o papel dos MAT no microambiente das neoplasias mamárias das cadelas, com perspectivas para novas estratégias terapêuticas específicas.

Nossos resultados enfatizam a importância de introduzir nos resultados de exames histopatológicos a caracterização e distribuição do infiltrado inflamatório, e futuramente, espera-se que esta informação seja um parâmetro complementar no estabelecimento do comportamento biológico do tumor e prognóstico.

Nesse contexto, novas propostas de estudo podem ser estabelecidas com o objetivo de avaliar a presença destes macrófagos nos sítios metastáticos e o perfil de citocinas secretados por essas células.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINA, J. E. et al. Regulation of macrophage functions by L-arginine. *J. Exp. Med.*, v. 169, p. 1021-9, 1989.

ALLAVENA, P.; CHIEPPA, M , BIANCHI G, SOLINAS G, FABBRI M, et al. Engagement of the mannose receptor by tumoral mucins activates an immune suppressive phenotype in human tumor-associated macrophages. *Clin Dev Immunol*, 2010;2010:547179

AUGER, M.J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C. E.; MCGEE, J. O. D. **The macrophage**. New York, NY: Oxford University Press, 1992. p. 3-56.

BEIRÃO, B.C.B. et al. Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. *BMC Vet. Res.*, v.11, n.151, p. 1-14, 2015.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.*, v. 196, p. 254–265, 2002.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol*, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol*. v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

BOUDREAU, N.; MYERS, C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res.*, v. 5, p. 140–146, 2003.

CASSALI, G.D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.*, v. 7, n. 2, p. 153-180, 2014.

CONDEELIS, J.; AND POLLARD, J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, v. 124, p. 263–266, 2006.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

DENKERT, C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, p. 105-113, 2010.

DOEDENS, A. L. et al. *Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression.* **Cancer Res.**, v. 70, p. 7465–7475, 2010.

DUTRA, A.P. et al. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. **Arq. Bras. Med. Vet.**, v. 60, p. 1403-1412, 2008.

ESTRELA-LIMA, A. et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, n. 256, p. 1-14, 2010.

GAUTIER, E. L. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 11, p. 1118–1128, 2012.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, n.1, p. 23–35, 2003.

GOSWAMI, S. et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1 / epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Res**, v. 65, n. 12, p. 5278–5284, 2005.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annu. Rev. Physiol.** N. 57, p. 707–736, 1995.

GWAK, J.M. et al. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic location and hormone receptor status in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2015.

GYORKI, D. E.; LINDEMAN, G. J. Macrophages, more than just scavengers: Their role in breast development and cancer. *Anz Journal of Surgery*, v.78, n. 6, p.432–

436, 2008.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, v.235, p. 473-6, 1987.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.*, v. 133, n.4, p. 246-252, 2005.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KITAMURA, T.; QIAN, B-Z.; POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 15, n. 2, p. 73–86, 2015.

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

KROL, M. et al. Global gene expression profiles of canine macrophages and canine mammary cancer cells grown as a co-culture in vitro. *BMC Vet Res.*, v. 8, n.16, p. 1-20, 2012.

LEEK, R. D. et al. Association of Macrophage Infiltration with Angiogenesis and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. *Cancer Res.*, n. 56, n. 20, p. 4625–4629, 1996.

LEEK, R.; HUNT, N.; LANDERS, R. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J. Pathol.*, v. 190, n. 4, p. 430–436, 2000.

LEWIS, C. E.; HUGHES, R. Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2. *Breast Cancer Res.*, v. 9, n.3, p. 209, 2007.

LEWIS, C. E.; POLLARD, J.W. Distinct role of macrophages in different

tumor microenvironments. **Cancer Res.**, v.66, n. 2, p. 605-612, 2006.

LIN, E. Y. et al. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 147-62, 2002.

LINGEN, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.125, n.1, p. 67–71, 2001.

MAHMOUD, S. M. A. et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology.*, v. 65, n. 2, p. 1–5, 2012.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature.**, v. 454, n. 7203, p. 436–44, 2008.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.**, v. 229, n.2, p. 176–185, 2013.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MANTOVANI, A. et al. Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype. **Breast.**, v. 16, suppl. 2, p. S27–S33, 2007.

MANTOVANI, A. et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. **Immunol. Today**, v. 13, n.7, p. 265–270, 1992.

MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 2, p. 231–237, 2010.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n.7164, p.819-26, 2007.

MISDORP, W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: SERIES, S. (Ed.). **WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals**. Washington: DC: AFIP, 1999. p.59.



MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MURATA, Y. et al. IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2866-2873, 2002.

MURDOCH, C. et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 618–631, 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v.420, n. 6917, p. 846–852, 2002.

NG, T. H. S. et al. *Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10*. **Front. Immunol.**, v.4, n. 129, p. 1-13, 2013.

NIEDBALA, W.; CAI, B.; LIEW, F. Y. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. **Ann. Rheum. Dis**, n.65, suppl. 3, p. iii37–iii40, 2006.

OSTRAND-ROSENBERG, S.; SINHA, P. Macrophages and tumor development. **Cancer Immunol.**, p. 131–55, 2008.

OWEN, L. N.; WHO. **Classification of tumours in domestic animals**. World Health Organization: Geneva: 3-53 p. 1980.

PICONESE, S.; COLOMBO, M. P. *Regulatory T Cells in Cancer /Tumor-Induced Immune Suppression*. Springer. 2008.

POLLARD, J. W. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. **J Leukocyte Biol.**, v. 84, n. 3, p. 84:623, 2008.

POLLARD, J.W. Trophic macrophages in development and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n.4, p. 259-70, 2009.

POLLARD, J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, n. 1, p. 71–78, 2004.

QIAN, B.Z. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor

metastasis. **Nature.**, v. 475, n. 7355, p. 222–225, 2011.

QIAN, B. -Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell.**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

RAPOSO, T. P. et al. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 12, n. 1, p. 10-19, 2014.

RAPOSO, T.P. et al. Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. **Vet. Comp. Oncol.**, v. 13, n. 4, p. 464-474, 2015.

RODRIGUES, M. A. et al. Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland. **Pathol. Res. Pract.**, n. 212, n. 4, p. 340-4, 2016.

RODRIGUEZ, P. C. et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. **Cancer Res.**, v.64, n. 16, p. 5839-49, 2004.

RUFFELL, B.; COUSSENS, L. M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. **Cancer Cell.**, v. 27, n. 4, p. 462–472, 2015.

SCHMIEDER, A. et al. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. **Sem. Cancer Biol.**, v. 22, n. 4, p. 289– 297, 2012.

SEO, A. N. et al. Tumour-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 109, p. 2705-2713, 2013.

SHIH, J. Y. et al. Tumor-associated macrophage: Its role in cancer invasion and metastasis. **J. Cancer Mol.**, v. 2, n. 3, p. 101–6, 2006.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Sem. Cancer Biol.**, v. 18, n. 5, p. 349–355, 2008.

SINGH, R. et al. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L- arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in

MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.*, v. 60, p. 3305-12, 2000.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 86, n. 5, p. 1065-73, 2009.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J. e MACEWEN'S, E. G. (Ed.). **Small clinical veterinary oncology**. 5th. St Louis: Saunders Elsevier, 2013. p.538-556.

SVENSSON, J. et al. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.*, v. 187, n. 7, p. 3671–3682, 2011.

TANAKA, K. et al. The expression of monocyte chemotactic protein-1 in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and tumor recurrence. *Thyroid.*, v. 19, n. 1, p. 21–25, 2009.

TAKEUCHI, T. et al. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 10, n. 16, p. 5572-5579, 2004.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H.; BROWN, G. D. et al. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.*, v. 23, p. 901–944, 2005.

TUOMINEN, W.J. et al. ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Res.*, v. 12, n.4, R56, 2010.

UENO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, v.6, p. 3282–3289, 2000.

VALKOVIĆ, T. et al. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.*, v. 440, p. 583–588, 2002.

WANG, B. et al. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class

II(hi) to MHC class II(low) mediates tumor progression in mice. **BMC Immunol.**, v. 12, n. 43, p. 1-12, 2011.

WEIDNER, N. Measuring intratumoral microvessel density. **Methods Enzymol.**, v. 444, p. 305-323, 2008.

WILLIAMS, C. B.; YEH, E. S.; SOLOFF, A. C. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. **npj Breast Cancer.**, n. 15025, 2016.

WYCKOFF, J. B. et al. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. **Cancer Res.**, v. 64, p.7022–9, 2004.

WYCKOFF, J. B. et al. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. **Cancer Res.**, v. 67, p. 2649–2656, 2007.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.

YOSHIDOME, H. et al. Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases. **Int. J. Oncol.** v. 34, p. 923–930, 2009.

ZIJLMANS, H. J. et al. The absence of CCL2 expression in cervical carcinoma is associated with increased survival and loss of heterozygosity at 17q11.2. **J. Pathol.**, v. 208, n. 4, p. 507–517, 2006.

## 10.ANEXOS

### Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

|   |  |
|---|--|
| <p><b>Tumor Primário (T)</b></p> <p><b>T0 Tumor não detectável</b></p> <p><b>T1 Tumor &lt; 3 cm</b><br/>a : não fixo<br/>b : fixo à Pele<br/>c : fixo ao Músculo</p> <p><b>T2 Tumor de 3 – 5 cm</b><br/>a : não fixo<br/>b : fixo à Pele<br/>c : fixo ao Músculo</p> <p><b>T3 Tumor &gt; 5 cm</b><br/>a : não fixo<br/>b : fixo à Pele<br/>c : fixo ao músculo</p> <p><b>T4 Tumor de Taman (Carcinoma inflamatório)</b></p> | <p><b>Linfonodos Regionais (N)</b></p> <p><b>N0</b> Sem evidência de linfonodo (axilares ou inguinais)</p> <p><b>N1</b> Linfonodo Ipsilateral envolvido<br/>a : não fixo<br/>b : fixo</p> <p><b>N2</b> Linfonodos bilaterais envolvidos<br/>a : não fixo<br/>b : fixo</p> <p><b>Metástases à Distância (M)</b></p> <p><b>M0</b> Sem evidência de metástase distante</p> <p><b>M1</b> Metástase distante linfonodos não-regionais</p> |
|---|--|

### Agrupamento por estádios

Estadiamento da OMS modificado para tumores mamários da cadela

| Estadiamento | T             | N          | M  |
|--------------|---------------|------------|----|
| Estádio I    | T1            | N0         | M0 |
| Estádio II   | T2            | N0         | M0 |
| Estádio III  | T3            | N0         | M0 |
| Estádio IV   | T1; T2;<br>T3 | N1         | M0 |
| Estádio V    | T1; T2;<br>T3 | N0 ;<br>N1 | M1 |

T- Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase  
(FONTE: CAVALCANTI e CASSALI, 2006, modificado de OWEN, 19

**Anexo 2** - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.


| <b>Características</b>  | <b>Pontuação</b> |
|---|------------------|
| <b>Formação tubular</b>   |                  |
| 75% do tumor  | 1                |
| 10 a 75% do tumor   | 2                |
| < 10% do tumor  | 3                |
| <b>Pleomorfismo nuclear</b>   |                  |
| Tamanho nuclear semelhante á célula normal (2 a 3 x o tamanho da hemácia) | 1                |
|   | 2                |
| Moderado aumento e variabilidade Grande variação                          | 3                |
| <b>Índice mitótico</b>  |                  |
| 0 a 8 mitoses   | 1                |
| 9 a 16 mitoses  | 2                |
| 17 ou mais mitoses  | 3                |

#### **Alocação do grau tumoral**

| <b><u>Total de escore</u></b> | <b><u>Grau de malignidade</u></b> |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 3 – 5                         | I                                 |
| 6 – 7                         | I<br>I                            |
| 8 – 9                         | I                                 |

(FONTE: CASSALI *et al.*, 2011a, modificado de ELSTON e ELLIS, 1998)

### Anexo 3- Certificado CEUA

|   |   |
|---|---|
|  <p><b>UFMG</b></p>  | <p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p><b>CEUA</b></p> <p><b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p> |
| <p><b>CERTIFICADO</b></p>   |   |
| <p>Certificamos que o Protocolo nº. B1 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Estudo das subpopulações M1 e M2 de MATs e da expressão de CCR2 nos carcinomas mamários de cadelas", que tem como responsável Geovanni Dantas Cassali, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 19/11/2013.</p> <p>Este certificado espira-se em 19/11/2018.</p> |   |
| <p><b>CERTIFICATE</b></p>   |   |
| <p>We hereby certify that the Protocol nº. B1 / 2013, related to the Project entitled "Studies on M1 and M2 TAMs subpopulations and CCR2 expression 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 (CEUA/UFMG), and was approved in 19/11/2013.</p> <p>This certificates expires in 19/11/2018.</p>    |   |
| <p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS<br/>         Coordenador(a) da CEUA/UFMG<br/>         Belo Horizonte, 19/11/2013.</p>  |   |
| <p>Atenciosamente.</p>  |   |
| <p>Sistema CEUA-UFMG</p>  |   |
| <p><a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>  |   |
| <p>Universidade Federal de Minas Gerais<br/>         Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha<br/>         Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005<br/>         31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil<br/>         Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592<br/> <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>  |   |

## APÊNDICES

### APÊNDICE A- Atividades desenvolvidas no período do doutorado

#### EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

1. Professora do Curso de Especialização em Citopatologia Veterinária – Anclivepa/ São Paulo: 2014.
2. Professora da Escola Superior São Francisco de Assis (ESFA), Santa Tereza/ Espírito Santo: 2017/01.
3. Responsável Técnica: Consultoria Diagnóstica em Patologia Veterinária, Vitória/ Espírito Santo: 2017 – atual.
4. Participação no projeto de Extensão Universitária “Diagnóstico cito e histopatológico de biópsias caninas e felina” realizado no Instituto de Ciências Biológicas, sob coordenação do professor Dr. Geovanni Dantas Cassali: 2013-2016.

#### TRABALHOS NÃO RELACIONADOS À TESE

##### Resumos publicados em anais de eventos

CAMPOS, C.B.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; **MONTEIRO, L.N.**; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Carcinoma cribriforme em estadiamento avançado na glândula mamária canina relato de caso. In: 3º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária/ENAPAVE, 2015, Belo Horizonte. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária/ENAPAVE, 2015.

MELLO, E.M.; **MONTEIRO, L.N.** ; CASSALI, G. D. ; GUIMARAES, M. P. . Avaliação anatomopatológica das lesões gástricas em *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) causadas pelo parasitismo por *Ophidascaris arndti*. In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, 2015, Belo Horizonte. Anais do III Congresso de Brasileiro de Patologia Veterinária, 2015.

CASSALI, G. D. ; **MONTEIRO, L.N.** ; GAMBA, C. O. ; DAMASCENO, K. A. ; CAMPOS, C. B. ; SALGADO, B. S. . Cytological aspects of mammary papilla discharge of canine micropapillary carcinoma: case report. In: I Simpósio Internacional de



Oncologia, 2014, Botucatu. I Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, 2014.

SOUZA, C. M. ; GAMBA, C. O. ; **MONTEIRO, L.N.** ; NUNES, F. C. ; FERREIRA, E. ; CASSALI, G. D. . Melanoma com metaplasia condróide em um canino: relato de caso. In: II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE/ VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013, Curitiba. II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013.

GAMBA, C. O. ; **MONTEIRO, L.N.** ; NUNES, F. C. ; ARAUJO, M. R. ; FERREIRA, E. ; CASSALI, G. D. . Tumor de bainha de nervo periférico maligno do plano nasal em um felino: relato de caso. In: II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE/ VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013, Curitiba. II Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013.

**MONTEIRO, L.N.**; ARAUJO, M. R.; REIS, D. C.; CAMPOS, C. B.; FERREIRA, E. ; CASSALI, G. D. . Teratoma maligno extragonadal em um cão. In: I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE/ VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013, Curitiba. I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária - XVI ENAPAVE VI Simpósio Brasileiro da CL Davis Foundation, 2013.

NUNES, F. C. ; GAMBA, C. O. ; DAMASCENO, K. A. ; CAMPOS, C. B. ; HORTA, R. S. ; ARAUJO, M. R. ; **MONTEIRO, L.N.** ; LAVALLE, G. E. ; FERREIRA, E. ; CASSALI, G. D. . Analisis of Clinico-Pathological Data, Therapeutical Conduct and Overall Survival of Canine Mammary Lesions Attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). In: II Encontro de Patologia Mamaria Diagnostico, Prognostico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela, 2014, Belo Horizonte. In: II Encontro de Patologia Mamaria Diagnostico, Prognostico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela, 2013, Belo Horizonte. Abstract - II Encontro de Patologia Mamaria Diagnostico, Prognostico e Tratamento das Neoplasias Mamárias da Cadela, 2013. v. 7. p. 122-126.

#### **Artigos completos não relacionados à tese**

SALGADO, B. S. ; **MONTEIRO, L.N.** ; COLODEL, M. M. ; FIGUEIROA, F. C. ; SOARES, L. M. ; NONOGAKI, SUELY ; ROCHA, RAFAEL M. ; ROCHA, N. S. .

Clinical, cytologic, and histologic features of a mammary micropapillary carcinoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 42, p. 382-385, 2013.

CASSALI, G.D., LAVALLE, G.E., FERREIRA, E., ESTRELA-LIMA, A., NARDI, A.B., FERNANDES, C.G., SOBRAL, R.A., AMORIM, R.L., OLIVEIRA, L.O., SUEIRO, F.A.R., BESERRA, H.E.O., BERTAGNOLLI, A.C., GAMBA, C.O., DAMASCENO, K.A., CAMPOS, C.B., ARAUJO, M.R., CAMPOS, L.C., **MONTEIRO, L.N.**, NUNES, F.C., HORTA, R.S., REIS, D.C., LUVIZZOTO, M.C.R., MAGALHÃES, G.M., RAPOSO, J.B., FERREIRA, A.M.R., TANAKA, N.M., GRANDI, F., UBUKATA, R., BATSCHINSKI, K., TERRA, E.M., SALVADOR, R.C.L., JARK, P.C., DELECRODI, J.E.R., NASCIMENTO, N.A., SILVA, D.N., SILVA, L.P., FERREIRA, K.C.R.S., FREHSE, M.S., SANTIS, G.W., SILVA, E.O., GUIM, T.N., KERR, B., CINTRA, P.P., SILVA, F.B.F., LEITE, J.S., MELLO, M.F.V., FERREIRA, M.L.G., FUKUMASU, H., SALGADO, B.S., TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, p.38 - 69, 2014.

SALGADO, B. S.; **MONTEIRO, L.N.** ; CASSALI, G. D. ; ROCHA, N.S. ; GÄRTNER, F. . Rare Histotypes of Canine Mammary Neoplasms. *Source Journal of Veterinary Science*, v. 1, p. 1-6, 2014.

CASSALI, G.D; **MONTEIRO, L.N.**; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A. ; DE CAMPOS, C. B.; SALGADO, B.S. Cytologic analysis of the mammary papillary discharge in a canine micropapillary carcinoma. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 44, p. n/a-n/a, 2015.

CAMPOS, C.B, LAVALLE, G.E, LIGÓRIO, S.F, **MONTEIRO, L.N**, AMORIM, R.L, CASSALI, G.D. Thalidomide Treatment in a Canine Mammary Gland Carcinosarcoma Presenting Pulmonary Metastasis. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, V. 5, p.120 -126, 2017.