



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA

CATARINA ISABEL GOMES ARRANJA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dr.^a Cláudia Godinho Correia

ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

CO-ORIENTADORA

Dr.^a Cláudia Godinho Correia

2015

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA

CATARINA ISABEL GOMES ARRANJA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Maria da Conceição da Cunha e
Vasconcelos Peleteiro

Doutor Mário António Pereira da Silva
Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

CO-ORIENTADORA

Dr.^a Cláudia Godinho Correia

2015

LISBOA

Que pense exclusivamente em aumentar a luz natural da sua razão não para resolver esta ou aquela dificuldade escolar, mas, para que, em cada circunstância da sua vida, a inteligência mostre à sua vontade o que deve escolher.

Descartes

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas que contribuíram para que esta Dissertação de Mestrado se tornasse possível. Desta forma, gostaria de agradecer:

Aos meus pais, por toda a liberdade, confiança, apoio e inspiração com os quais me brindaram tanto ao longo do curso como da minha vida. À minha família pelo alicerce que obviamente são, em especial ao meu avô Manuel, cujo orgulho na neta foi constante, e à minha avó “Tó”.

Ao Professor Jorge Correia por toda a amizade, disponibilidade, paciência, ensinamentos e boa disposição. Por me ter cativado para a área da Anatomia Patológica logo como aluna de 2º ano durante as aulas práticas de necrópsia.

À Dr.^a Cláudia Correia por toda a fase de prática clínica do meu estágio e pela oportunidade de estagiar na Alcabidechevet. Um obrigada que começa pelos ensinamentos transmitidos, passa pela possibilidade de recolha de amostras e termina nas correções diárias das venopunções.

À Professora Doutora Conceição Peleteiro por ter autorizado a realização do meu estágio no Serviço de Anatomia Patológica permitindo a execução do trabalho experimental incluído nesta Dissertação de Mestrado.

Ao Dr. João Martins, por me fazer sentir confortável numa sala de cirurgia. Ao Dr. Rui Patrício e à Dr.^a Patrícia Caleiro. À Dr.^a Marta Caixinha e à Rosa, pela amizade.

À Dr.^a Sandra Carvalho por toda a disponibilidade, paciência e ajuda na realização da técnica de imunohistoquímica. À Dr.^a Maria João Soares e à Dr.^a Rute Noiva.

À Dr.^a Ana Murta e Dr. Rodrigo Bom por me permitirem a recolha das amostras. Ao Professor António Duarte e à Professora Isabel Neto pela imediata disponibilidade e ajuda.

À D.^a Maria do Rosário Luís e à D.^a Maria Augusta por todo o apoio e simpatia.

À Rita, ao Tiago e à Marta que, ao longo destes 6 anos infindáveis, sempre estiveram comigo.

Ao Márcio, ao Bruno Ferro, à Tânia, à Joana e à Sara por me facultarem o devido descanso das ideias veterinárias e me permitirem crescer noutras vertentes.

À Olívia e a todos os meus impulsionadores de quatro patas.

Resumo

Estudo da resposta inflamatória em tumores mamários de cadela

Os tumores mamários apresentam uma elevada prevalência em cadelas e constituem uma importante entidade clínica nesta espécie. O papel do sistema imunitário no desenvolvimento tumoral tem sido largamente estudado, porém, o seu valor prognóstico ainda não está estabelecido.

Neste trabalho foi realizado o estudo da resposta inflamatória associada aos tumores e investigada a sua associação com parâmetros de caráter prognóstico.

Colheram-se 49 massas da região mamária a partir das quais se selecionaram 41 tumores mamários. Nestes, identificaram-se diferentes populações celulares inflamatórias (linfócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos). O infiltrado linfoide foi quantificado em ausente (48,78%), escasso (16,66%), moderado (26,83%) e abundante (7,32%) e a sua distribuição foi caracterizada.

Em 13 carcinomas efetuou-se a fenotipagem linfocitária B/T, recorrendo a imunohistoquímica e utilizando os anticorpos: PAX5 (Leica-PA0552) e CD3 (Dako-A0452). Os resultados foram avaliados pela percentagem e densidade de células marcadas como positivas.

Não se verificaram correlações entre as duas populações linfocitárias identificadas. No conjunto dos tumores analisados, foi verificado um valor médio superior de células positivas a anti-PAX5. Foram obtidas fortes associações entre a percentagem e a densidade de células positivas para cada imunomarcador.

Não se verificaram associações com parâmetros prognósticos, sendo necessária mais investigação para compreensão do papel da resposta inflamatória nestes tumores.

Palavras-chave: tumor mamário; cadela; resposta inflamatória; linfócitos

Abstract

Study of the inflammatory response in canine mammary tumours

Mammary gland tumours exhibit a high prevalence in bitches and are regarded as an important clinical entity in this species. The role of immune system in tumorigenesis has been widely studied however, its prognostic value is not yet established.

In this study, tumour-associated inflammatory response was studied and its association with prognostic parameters was investigated.

Forty-one mammary tumours were selected to study from 49 mammary masses collected. In the selected tumours different inflammatory cell populations were identified (lymphocytes, neutrophils, macrophages and mast cells). Lymphoid infiltrate was quantified as follows: absent (48,78%), scarce (16,66%), mild (26,83%) and abundant (7,32%). Its distribution was also characterized.

B and T-cell phenotyping was performed in 13 carcinomas by immunohistochemistry using two antibodies: Pax5 (Leica-PA0552) and CD3 (Dako-A0452). Results were evaluated through the percentage and density of positive cells.

There was no statistically significant correlation between the identified lymphocyte populations. Regarding lymphocyte density, a superior mean value of anti-PAX5 positive cells was verified in the whole group of studied tumours. Strong associations were observed between the percentage and the density of positive cells for each of the immunomarkers.

There were no statistically significant associations with prognostic parameters. Further investigation will be required in order to understand the role of inflammatory response in canine mammary tumours.

Keywords: mammary tumour; bitch; inflammatory response; lymphocytes

Índice

Índice.....	ix
Lista de figuras.....	xii
Lista de gráficos.....	xii
Lista de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
I. Atividades desenvolvidas no estágio curricular.....	1
1. Clínica Alcabidechevet.....	1
2. Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Anatomia Patológica.....	2
II. Introdução geral.....	3
III. Revisão bibliográfica.....	5
1. Tumores mamários em cadela.....	5
1.1. Revisão morfo-fisiológica da glândula mamária.....	5
1.2. Considerações epidemiológicas gerais.....	7
1.3. Etiologia e fatores de risco.....	8
1.3.1. Idade.....	8
1.3.2. Hormonas e fatores de crescimento.....	8
1.3.3. Suscetibilidade genética e genes supressores de tumores.....	10
1.3.4. Ciclooxigenases.....	11
1.3.5. Dieta e condição corporal.....	11
1.4. Diagnóstico e estadiamento.....	12
1.4.1. Apresentação clínica e diagnóstico.....	12
1.4.2. Diagnóstico citológico.....	14
1.4.3. Diagnóstico e classificação histopatológicos.....	15
1.5. Prognóstico.....	18
1.5.1. Tamanho do tumor.....	18
1.5.2. Metastização nos linfonodos regionais e à distância.....	19
1.5.3. Invasão dos tecidos e permeação vascular.....	19
1.5.4. Tipo histológico e diferenciação celular.....	20
1.5.5. Grau de malignidade histológica.....	20
1.5.6. Expressão dos recetores hormonais.....	21
1.5.7. Ciclooxigenases.....	22
1.5.8. Presença de células inflamatórias.....	22
1.6. Terapêutica.....	23
1.6.1. Abordagem cirúrgica.....	23
1.6.2. Quimioterapia e Radioterapia.....	24

1.6.3.	Terapêutica hormonal.....	25
1.6.4.	Outras terapêuticas	26
2.	Imunologia tumoral	28
2.1.	Aspetos gerais e história	28
2.2.	Antígenos tumorais.....	30
2.3.	A resposta inflamatória e o cancro	31
2.4.	Componentes celulares do infiltrado inflamatório	32
2.4.1.	Linfócitos.....	33
2.4.2.	Neutrófilos.....	37
2.4.3.	Mastócitos	38
2.4.4.	Macrófagos.....	39
2.5.	Mediadores inflamatórios	40
2.6.	Imunoterapia antitumoral.....	42
IV.	Estudo da resposta inflamatória em tumores mamários de cadela	46
1.	Objetivos do trabalho experimental	46
2.	Material e métodos	47
2.1.	Amostragem.....	47
2.1.1.	Recolha e processamento	47
2.1.2.	Diagnóstico e exame histopatológico.....	47
2.2.	Imunohistoquímica	49
2.2.1.	Seleção das amostras para imunohistoquímica	49
2.2.2.	Protocolo utilizado	49
2.2.3.	Método de contagem das células linfoides marcadas por imunohistoquímica	52
2.2.4.	Avaliação dos resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica.....	52
2.3.	Análise estatística	53
3.	Resultados	54
3.1.	Caracterização das variáveis clínicas e anatomopatológicas da população com patologia mamária	54
3.1.1.	Caracterização e distribuição etária, rática e do estado reprodutivo das cadelas com patologia mamária.....	54
3.1.2.	Caracterização e distribuição da patologia com origem na região da glândula mamária	54
3.1.3.	Caracterização das neoplasias de origem mamária	56
3.2.	Estudo da resposta inflamatória em tumores mamários de cadela	61
3.2.1.	Estudo da resposta inflamatória presente nas lâminas com coloração H&E (n=41)	61
3.2.2.	Estudo do infiltrado linfóide em carcinomas mamários caninos por imunohistoquímica (n=13).....	64
4.	Discussão.....	73

V. Conclusão e perspectivas futuras	84
VI. Bibliografia.....	86
VII. Anexos	98

Lista de figuras

Figura 1- Formas de interação das diferentes subpopulações de linfócitos T com a célula neoplásica.	36
Figura 2- Propriedades reguladoras dos linfócitos B que promovem o crescimento tumoral.	37
Figura 3 – Caracterização e distribuição dos processos patológicos presentes na região da glândula mamária.....	55
Figura 4- Lesões mamárias de animais incluídos neste estudo.....	58
Figura 5 – Lesões de ulceração e necrose.	59
Figura 6- Permeação vascular e metastização regional.	60
Figura 7- Locais de distribuição do infiltrado linfoide.	61
Figura 8- Presença de macrófagos e granulomas organizados em carcinomas mamários.....	63
Figura 9- Presença de mastócitos em carcinoma mamário.	63
Figura 10- Imunomarcagem com o anticorpo anti-CD3.	65
Figura 11- Imunomarcagem com o anticorpo anti-PAX5.....	66

Lista de gráficos

Gráfico 1- Caracterização e distribuição dos processos patológicos presentes na região da glândula mamária.....	55
Gráfico 2 – Distribuição das neoplasias de origem mamária segundo a sua classificação histológica.	56
Gráfico 3- Distribuição dos tumores mamários consoante a localização da lesão.	59
Gráfico 4- Distribuição de acordo com as categorias de quantificação do infiltrado linfoide.....	62
Gráfico 5 – Caracterização da distribuição dos valores médios da densidade linfocitária para cada marcação consoante os parâmetros histológicos considerados e o tamanho do tumor.....	72

Lista de tabelas

Tabela 1 – Estadiamento dos tumores mamários caninos.....	14
Tabela 2- Classificações histológicas de tumores mamários caninos.....	16
Tabela 3- Critérios utilizados na determinação do grau de malignidade de carcinomas mamários caninos.	21
Tabela 4 - Técnicas para a terapêutica cirúrgica de tumores mamários, definições e indicações.	24
Tabela 5 - Classificação histológica, frequência absoluta e grau de malignidade das 49 massas da região mamária recolhidas.	48
Tabela 6 - Caracterização dos anticorpos primários utilizados e protocolo realizado.....	51
Tabela 7- Caracterização da dimensão do eixo-maior dos tumores mamários.....	57
Tabela 8- Distribuição dos tumores mamários pelas categorias de tamanho.	57
Tabela 9 – Valores da percentagem de células com marcação positiva para cada anticorpo.	64
Tabela 10- Resultados obtidos para a quantificação da densidade linfocitária.....	67
Tabela 11 – Resultados obtidos nas correlações realizadas entre os valores da percentagem de células positivas e o rácio dos valores da densidade linfocitária.	68
Tabela 12- Características anatomopatológicas dos carcinomas mamários avaliados no estudo imunohistoquímico.....	70

Lista de abreviaturas e símbolos

® – Marca registada

™ – *Trademark* (marca registada)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

AMC – Adenoma mamário complexo

AMS – Adenoma mamário simples

APC – *Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antigénios)

ATM – *ATM serine/threonine kinase*

BRCA1 – *Breast Cancer type 1 susceptibility gene*

BRCA2 – *Breast Cancer type 2 susceptibility gene*

Breg – Linfócitos B reguladores

CHEK2 – *Checkpoint kinase 2*

CD – *Cluster of differentiation*

CHOP – Protocolo quimioterápico com ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona

CM – Carcinoma mamário

cm – Centímetro

CMC – Carcinoma mamário complexo

CMS – Carcinoma mamário simples

COX-2 – Cicloxigenase-2

CSF-1 – *Colony stimulating factor-1* (fator 1 estimulante de colónias)

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

EGF – *Epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

EGFR – *Epidermal growth factor receptor* (recetor do fator de crescimento epidérmico humano)

FA – Frequência absoluta

FGF-2 – *Fibroblast growth factor 2* (fator de crescimento fibroblástico 2)

FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

FR – Frequência relativa

g – grama

GM-CSF – *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos)

H&E – Hematoxilina e eosina

HER-2 – *Human epidermal growth factor receptor 2* (recetor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2)

HGF – *Hepatocyte growth factor* (fator de crescimento dos hepatócitos)

HPF – *High-power field*

IGF – *Insulin-like growth factor* (fator de crescimento tipo insulina)

IGF-1 – *Insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento tipo insulina 1)

IHQ – Imunohistoquímica

IL – Interleucina

IFN- γ – Interferão *gamma*

LAK – *Lymphokine-activated killer*

LAK-1 – *Lymphokine-activated killer 1*

MHC I – *Major histocompatibility complex class I* (complexo maior de histocompatibilidade classe I)

MHC II – *Major histocompatibility complex class II* (complexo maior de histocompatibilidade classe II)

MMP-9 – Metaloproteinase da matriz - 9

Mw – Micro-ondas

n – Número de casos

N.A. – Não aplicável

NK – *Natural killer*

ng – Nanograma

OMS – Organização Mundial de Saúde

OSM – Oncostatina M

OVH – Ovariohisterectomia

p – Nível de significância estatística

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PBS – Tampão fosfato-salino

PDGF – *Platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaquetas)

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog* (gene supressor tumoral homólogo da fosfatase e tensina)

RE – Recetores de estrogénio

RP – Recetores de progesterona

SCF – *Stimulating colony factor* (fator estimulante de colónias)

TAA – *Tumour associated antigen* (antigénios associados aos tumores)

TAM – *Tumour-associated macrophages* (macrófagos associados aos tumores)

TAN – *Tumour-associated neutrophils* (neutrófilos associados aos tumores)

TGF – *Transforming growth factor* (fator de crescimento de transformação)

TGF- β – *Transforming growth factor beta* (fator de crescimento de transformação β)

TGF- β 1 – *Transforming growth factor beta subtype 1* (fator de crescimento de transformação β subtipo 1)

Th1 – Linfócito T *helper* 1

Th2 – Linfócito T *helper* 2

TIL – *Tumour-infiltrating lymphocytes* (linfócitos infiltrados no tumor)

TNF- α – *Tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

TNM – *Tumour-nodes-metastasis* (Tumor, linfonodos, metástases – sistema de classificação TNM)

TP53 – *Tumour protein p53* (Proteína tumoral p53)

Treg – Linfócitos T reguladores

TSA – *Tumour specific antigen* (antígenos específicos de tumores)

UA – Unidade de área

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento do endotélio vascular)

W – Watt

I. Atividades desenvolvidas no estágio curricular

O estágio decorreu no período de tempo compreendido entre 2 de setembro e 7 de março e foi constituído por dois períodos de atividades distintas. Na primeira fase foram desenvolvidas atividades na área de clínica de animais de companhia durante o período entre 2 de setembro e 1 de dezembro, perfazendo aproximadamente 500 horas de prática médico-veterinária, numa média de 40 horas semanais. Foi-me semanalmente solicitada a apresentação de um trabalho escrito com um tema à minha escolha.

No período entre 3 de dezembro e 7 de março estagiei no Departamento de Anatomia Patológica, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL). Realizei várias atividades que perfizeram um total de aproximadamente 350 horas.

1. Clínica Alcabidechevet

A clínica é constituída por duas salas de consulta, sala de imagiologia e análises clínicas, internamento, escritório, armazém, sala de tosquiadas, sala de preparação cirúrgica e sala de cirurgia. O corpo clínico é constituído por 5 médicos veterinários: Dr.^a Cláudia Correia (diretora clínica), Dr. João Martins, Dr. Rui Patrício, Dr.^a Patrícia Caleiro e Dr.^a Marta Caixinha. Colaboram ainda 2 enfermeiras veterinárias e uma auxiliar.

As atividades desenvolvidas decorreram no âmbito de clínica de animais de companhia com as componentes de medicina interna, internamento, imagiologia e cirurgia. A maioria da casuística assistida durante o estágio foi relativa a canídeos e felídeos. Menos frequentemente, assisti a casos que envolveram animais exóticos nomeadamente lagomorfos, pequenos roedores e aves. No âmbito da medicina interna pude assistir a consultas, perfazendo um número aproximado de 65 consultas semanais, nas quais acompanhei a realização de anamnese e exame físico, colheitas sanguíneas, cateterizações, vacinações, desparasitações, administrações de fármacos, avaliações da evolução do processo de cicatrização de feridas e suturas, aplicação e mudança de pensos, remoção de pontos e procedimentos de eutanásia e quimioterapia.

No internamento acompanhei monitorizações durante o período pós-operatório e administração de fármacos, além de prestar cuidados básicos de higiene e alimentação.

Executei e interpretei os resultados de análises de urina, hematológicas e bioquímicas sanguíneas. Observei ao microscópio esfregaços sanguíneos para pesquisa de hemoparasitas, sedimento urinário e raspagens cutâneas para pesquisa de ácaros e fungos. Colaborei na

realização de ecografias, ecocardiografias, radiografias simples, radiografias contrastadas e eletrocardiogramas.

Na área de cirurgia pude acompanhar a preparação pré-cirúrgica, indução e manutenção anestésicas e o fornecimento do material de cirurgia. Assisti a, aproximadamente, 6 procedimentos cirúrgicos semanais nomeadamente mastectomias, ovariohisterectomias (OVH) eletivas, OVH para resolução de piómetra, extrações dentárias, destartarizações, orquiectomias (caninas e felinas), drenagens de otomatomas, amputações da cauda, entre outros.

Acompanhei a Dr.^a Cláudia Correia em dois serviços de domicílio para realização de penso e eutanásia e contactei com situações de emergência médico-cirúrgica, acompanhando e participando na estabilização de animais traumatizados por mordedura ou atropelamento e em situações de *status epilepticus*. Assisti também a consultas, exames imagiológicos e cirurgia de animais exóticos com o Dr. Rui Patrício, bem como à prática de acupunctura pela Dr.^a Patrícia Caleiro em situações de dor crónica em pacientes geriátricos.

2. Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Anatomia Patológica

Durante o estágio em Anatomia Patológica contactei com vários procedimentos e técnicas laboratoriais e desenvolvi diferentes atividades. Colaborei em aproximadamente 100 exames histopatológicos de tumores mamários, nos quais realizei o corte de material e a posterior observação microscópica para diagnóstico histopatológico.

Executei cerca de 40 necrópsias de canídeos, felídeos, lagomorfos e aves e realizei a observação microscópica do material recolhido para exame histopatológico proveniente de alguns destes casos. Tive ainda a oportunidade de poder assistir a aulas práticas de Anatomia Patológica e auxiliar os alunos na realização da técnica de necrópsia.

Assisti a 12 consultas de Citologia realizadas no Hospital da FMV-UL nas quais pude observar a execução da técnica de punção aspirativa com agulha fina e ajudar na contenção dos pacientes. Fiz observação das lâminas resultantes destas consultas, com especial atenção nos casos de lesões com origem ao nível da glândula mamária.

Assisti e realizei técnicas de imunohistoquímica.

No decorrer da atividade prática, procedi à colheita de material proveniente de mastectomias de cadelas realizadas na clínica Alcabidechevet e no Hospital Escolar da FMV-UL. Tive a oportunidade de realizar a colheita, exame macroscópico e análise histopatológica dos tumores mamários incluídos neste estudo, podendo desenvolver aptidões técnicas e de diagnóstico.

II. Introdução geral

Os tumores mamários perfazem metade da totalidade dos tumores registados em cadelas (Johnson, 2009) sendo as neoplasias mais registadas em fêmeas inteiras (Rasotto, Zappulli, Castagnaro & Goldschmidt, 2012; Sorenmo, Worley & Goldschmidt, 2013). As neoplasias mamárias caninas são caracterizadas pela sua diversidade histológica, não obstante, verifica-se uma prevalência significativa de carcinomas que os torna o tipo histológico mais comum (Peña et al., 2014; Rasotto et al., 2012). Cerca de 50% dos tumores mamários caninos são malignos e metade destes irá sofrer metastização (Euler, 2011) que, segundo Rasotto et al. (2012), é a principal causa de morte dos animais afetados.

O desenvolvimento de uma massa neoplásica é caracterizado por uma complexa interação simbiótica entre as células tumorais, as células do estroma tumoral e todo o microambiente que as rodeia, sustentando o crescimento da massa e favorecendo a sua disseminação. Os tecidos neoplásicos apresentam uma complexa organização, caracterizada pela infiltração por células inflamatórias (Trinchieri, 2012). Existe um tipo de carcinoma mamário bastante agressivo, o carcinoma mamário inflamatório, onde o termo “inflamatório” é aplicado para descrever as características macroscópicas observáveis ao exame clínico e não propriamente as suas características histológicas. Ao nível microscópico, os achados mais característicos são a marcada invasão dos vasos linfáticos da derme por células tumorais e não propriamente a presença de infiltrado inflamatório (Clemente, Pérez-Alenza & Peña, 2010). É importante salientar que a existência de uma resposta inflamatória com infiltração de células inflamatórias não é exclusiva deste tipo de carcinomas. Como poderemos ver no capítulo referente à imunologia tumoral presente neste trabalho, a presença de inflamação, com ou sem infiltrados celulares, pode ocorrer em vários tipos de tumores.

Há muito que os patologistas identificaram a existência de interações entre as células tumorais e o sistema imunológico considerando que as respostas inflamatórias observadas traduziam o combate ao tumor por parte do indivíduo. Rudolph Virchow, há aproximadamente 150 anos, já especulava a conexão entre a inflamação e o cancro após observar a presença de leucócitos em tumores mamários humanos (Morrison, 2012). Em 1909, Paul Ehrlich sugeriu que o sistema imunológico do indivíduo contribuía na prevenção do desenvolvimento tumoral (Chow, Möller & Smyth, 2012). Mais tarde, em 1957, Burnet e Thomas propuseram a teoria de que o sistema imunológico reconhece e elimina as células que sofreram transformações neoplásicas (Mittal, Gubin, Schreiber & Smyth, 2014).

As interações entre o sistema imunológico e as células tumorais são estudadas por uma área particular da imunologia denominada imunologia tumoral (Maia & Cardoso, 2012). Hoje em dia sabe-se que o sistema imunológico promove ou controla o crescimento tumoral. Estas ações contraditórias dependem, entre outros fatores, dos componentes do sistema imunológico envolvidos em cada processo e da natureza dos antígenos tumorais expressos pelas células neoplásicas (Mittal et al., 2014).

À medida que uma célula se transforma numa célula tumoral, adquire várias capacidades biológicas que permitem o crescimento tumoral e a metastização. Hanahan e Weinberg (2000) enumeraram as 6 capacidades biológicas adquiridas pelas células ao longo do desenvolvimento tumoral: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de inibição de crescimento, evasão à morte celular por apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogénese sustentada e invasão dos tecidos e metastização. Posteriormente, Hanahan e Weinberg (2011) definiram que a aquisição destas capacidades biológicas se deve à instabilidade genómica existente nas próprias células tumorais e ao microambiente inflamatório pró-tumoral que as rodeia. Adicionaram ainda duas capacidades biológicas consideradas emergentes: a reprogramação do metabolismo energético da célula e a evasão ao sistema imunológico.

O papel das células inflamatórias no desenvolvimento tumoral permanece uma área em debate. Em medicina humana, existem estudos nos quais está descrito o papel ambíguo de elementos celulares. Em cadela, ainda não foi realizada uma caracterização consensual dos vários fatores do microambiente tumoral, nomeadamente do tipo de populações de células inflamatórias (Kim, Yu, Yhee, Im & Sur, 2010).

Atualmente, o papel da reação inflamatória associada aos tumores tem sido alvo de variados estudos. Os tumores mamários de cadela, considerados modelos em estudos de oncologia comparada, permitem uma caracterização aprofundada da resposta do sistema imunológico aplicável à investigação do cancro da mama. Por este motivo, a investigação em neoplasias caninas deverá ser cada vez mais explorada.

No presente trabalho foi estudada a resposta inflamatória em tumores mamários caninos. Além de ter sido realizada a caracterização histopatológica de todos os tumores mamários obtidos, foi ainda efetuada a observação e caracterização dos focos da resposta inflamatória associada aos tumores e análise imunohistoquímica dos infiltrados linfóides identificados. Os resultados obtidos foram associados a fatores de caráter prognóstico na tentativa de inferir algumas conclusões.

III. Revisão bibliográfica

1. Tumores mamários em cadela

1.1. Revisão morfo-fisiológica da glândula mamária

A estrutura básica responsável pela glândula mamária é a crista ou linha mamária pré-natal que se estende, em forma de arco, entre as regiões axilar e inguinal (Evans & De Lahunta, 2013). No cão, a crista mamária está bem desenvolvida aos 25 dias de gestação e, por volta dos 30 dias (Evans & De Lahunta, 2013), podem ser observados vários botões mamários, nem sempre simétricos, a partir dos quais se desenvolverá o parênquima mamário apresentando 8 a 14 brotos epiteliais primários (Davidson & Stabenfeldt, 2013; Foster, 2007; McGeady, Quin, FitzPatrick & Ryan, 2006). O número de mamas varia entre 8 a 12, sendo mais frequente um total de 10 dividido em 4 glândulas torácicas, 4 abdominais e 2 inguinais de maior dimensão (Evans & De Lahunta, 2013).

A glândula mamária é uma glândula túbulo-alveolar composta (Zayas, Rodríguez, Thomas & Guisado, 2005) constituída por grupos adjacentes de alvéolos que formam lóbulos separados por tecido conjuntivo interlobular que, por sua vez, quando se juntam formam lobos (Davidson & Stabenfeldt, 2013; Sleenckx, Rooster, Kroeze, Van Ginneken & Van Brantegem, 2011).

Os alvéolos são constituídos por um epitélio simples cúbico cuja altura varia consoante a atividade secretora da glândula (Monteiro-Riviere, 1998; Sleenckx et al., 2011; Zayas et al., 2004). Entre a base das células epiteliais e a membrana basal do alvéolo são encontradas células mioepiteliais com filamentos citoplasmáticos de actina que se contraem em resposta à ação da oxitocina (Zayas et al., 2004), sendo responsáveis pela descida do leite (Sleenckx et al., 2011).

O sistema de ductos tem início nos ductos intralobulares que drenam no ducto lobular. Por sua vez, estes convergem nos ductos galactóforos (Monteiro-Riviere, 1998; Zayas et al., 2004). Os ductos intralobulares apresentam um epitélio simples cúbico rodeado por células mioepiteliais que, na porção distal dos ductos lobulares, já apresenta 2 camadas celulares. À medida que os ductos se fundem para formar os ductos galactóforos são observadas fibras musculares lisas longitudinais (Zayas et al., 2004). As aberturas externas dos ductos galactóforos apresentam um epitélio pavimentoso estratificado (Junqueira, 2008) e encontram-se distribuídas num padrão cribiforme irregular ao nível do mamilo, variando o seu número entre 7 a 16 (Evans & De Lahunta, 2013).

A vascularização da glândula é feita por diversas artérias e veias ipsilaterais (Sleenckx et al., 2011). As glândulas torácicas recebem sangue arterial através dos ramos craniais das artérias

torácicas internas. As artérias torácica lateral e intercostal podem, igualmente, contribuir na vascularização (Evans & De Lahunta, 2013). A mama abdominal cranial é nutrida pela artéria epigástrica superficial cranial. A artéria epigástrica superficial caudal vasculariza as glândulas abdominal caudal e inguinal. A mama abdominal caudal é ainda vascularizada por ramos das artérias pudendas externas e por ramos cutâneos das artérias frénico-abdominais. As glândulas inguinais são vascularizadas pela artéria pudenda externa e ramos cutâneos das artérias ilíacas (Sleeckx et al., 2011). A vascularização venosa da glândula mamária decorre em paralelo com a arterial. O sangue venoso das mamas torácicas é drenado nas veias torácicas internas, veias epigástricas superficiais craniais e veias intercostais (Evans & de Lahunta, 2013; Sleeckx et al., 2011). Os vasos das mamas abdominais e inguinal conduzem o sangue venoso para a veia epigástrica superficial caudal. As veias atravessam a linha média do animal mais frequentemente que as artérias e apresentam várias anastomoses crânio-caudais que facilitam a metastização nas glândulas mamárias contralaterais (Sleeckx et al., 2011).

Cada glândula possui o seu próprio plexo linfático com pequenos vasos linfáticos que formam anastomoses e se conjugam em vasos de maior calibre. Estes plexos são encontrados no parênquima, tecido subcutâneo e mamilo (Evans & de Lahunta, 2013). Os vasos linfáticos das mamas ipsi e contralaterais podem formar anastomoses. Geralmente, as glândulas torácicas drenam nos linfonodos axilares ipsilaterais e as mamas abdominais e inguinais nos linfonodos mamários ipsilaterais (Sleeckx et al., 2011). Contudo, em certos casos foram notadas variações no padrão de drenagem linfática: MacPhail (2013) refere que o linfonodo axilar drena as três primeiras glândulas e o linfonodo mamário as duas últimas e tanto Evans e De Lahunta (2013) como Murphy (2008) afirmam que a mama abdominal cranial pode drenar tanto no linfonodo axilar como no mamário.

A inervação é perivascular, encontrando-se na proximidade de artérias e arteríolas (Pinho & Gulbenkian, 2007). A mama torácica cranial é inervada por ramos cutâneos laterais do quarto, quinto e sexto ramos ventrais do nervo torácico (intercostal) e a glândula torácica caudal recebe os ramos cutâneos laterais do sexto e sétimo ramos ventrais do mesmo nervo. As mamas abdominais e inguinais são inervadas pelo nervo genitofemoral e ramos cutâneos ventrais dos primeiros três nervos lombares (Evans & De Lahunta, 2013).

O desenvolvimento pós-fetal ocorre à medida que o animal atinge a puberdade com a atividade cíclica ovárica e produção hormonal. O estrogénio, em conjunto com a hormona do crescimento e outras hormonas esteroides, é responsável pela proliferação do sistema de ductos. O desenvolvimento dos alvéolos decorre com a ação da progesterona e prolactina. A glândula permanece relativamente rudimentar até que ocorra uma gestação. A secreção do leite tem início durante a fase final da gestação devido ao aumento da secreção de prolactina que dá

origem à formação de colostro. No final da gestação, a glândula mamária passou de uma estrutura maioritariamente constituída por estroma conjuntivo a uma estrutura essencialmente constituída por parênquima secretor de leite (Davidson & Stabenfeldt, 2013). Após este período os alvéolos e os lóbulos sofrem redução, permanecendo apenas algumas destas estruturas (Evans & De Lahunta, 2013).

1.2. Considerações epidemiológicas gerais

Os tumores mamários são das neoplasias mais comuns em cadelas inteiras perfazendo uma percentagem superior a 40% dos tumores registados neste grupo populacional (Sorenmo et al., 2009). A incidência é decrescente em certas zonas geográficas como os Estados Unidos da América e Europa Ocidental onde a prática de OVH precoce se generalizou (Sleeckx et al., 2011). Egenvall et al. (2005) referem uma incidência anual de 111 tumores mamários por cada 10 000 cadelas com idades compreendidas entre os 3 e os 10 anos de idade. Dobson, Samuel, Milstein, Rogers e Wood (2002) referem uma incidência anual de 205 casos de tumores (26% malignos, 13% benignos e 61% não especificados) por cada 100 000 cães. Cerca de 50 a 70% dos animais com tumor mamário diagnosticado apresentam lesões nas várias glândulas. Cerca de 50% dos tumores mamários que se desenvolvem são malignos, na sua maioria carcinomas e menos de 5% sarcomas (Sleeckx et al., 2011).

As cadelas são 62 vezes mais suscetíveis que os machos ao desenvolvimento de tumores na glândula mamária (Euler, 2011). À semelhança do que acontece no homem, cujos casos reportados representam uma incidência inferior a 1% de todos os carcinomas mamários, a percentagem de neoplasias mamárias em machos varia desde 0 a 2,7% (Bearss, Schulman & Carter, 2012). Os machos afetados costumam apresentar desequilíbrios hormonais causados, por exemplo, por tumores das células de Sertoli secretoras de estrogénio (Ežerskytė, Zamokas, Grigonis & Juodžiukynienė, 2011).

Itoh et al. (2005) verificaram que a incidência da malignidade histológica e biológica é menor em cadelas de pequeno porte (25%) do que em raças de maior porte (58,5%). Certas raças têm uma incidência mais elevada de tumores mamários indicando que existe uma influência de fatores de risco genéticos (Borge, Børresen-Dale & Lingaas, 2011). As raças referenciadas como predispostas são: Caniche Toy e Miniatura, English Springer Spaniel, Brittany Spaniel, Cocker Spaniel, Puli, Setter Inglês, Pointers, Pastor Alemão, Maltês, Yorkshire Terrier e o Dachshund (Euler, 2011).

Misdorp (2002) refere que a frequência de aparecimento de tumores mamários (benignos e malignos) aumenta no sentido antero-posterior da cadeia mamária. Sleeckx et al. (2011),

Sorenmo, Rasotto, Zappulli e Goldschmidt (2011) e Sorenmo et al. (2013) corroboram o autor supramencionado ao referirem uma maior frequência de aparecimento de tumores nas zonas onde a cadeia mamária apresenta mais tecido, isto é, nas glândulas mais caudais. Conforme os autores anteriores Ežerskytė et al. (2011) referem que em 41% dos casos os tumores surgem ao nível da mama caudal abdominal e que, em 36% dos casos, surgem na mama inguinal. Stratmann, Failing, Richter e Wehrend (2008) mencionam que a maioria dos tumores se localiza ao nível da mama abdominal caudal e em 35% dos casos na mama inguinal. No estudo de Peleteiro, Branco e Correia (1996) as glândulas inguinais são as mais afetadas.

1.3. Etiologia e fatores de risco

1.3.1. Idade

O risco de aparecimento de tumores aumenta com a idade tornando-se significativo aos 7 e 8 anos e continuando a aumentar até aos 11 a 13 anos. A idade média de aparecimento de tumores mamários malignos está compreendida entre os 9 e os 11 anos enquanto que para tumores benignos se encontra entre os 7 e os 9 anos (Sorenmo et al., 2013). Ežerskytė et al. (2011) afirmam que os tumores mamários são mais comuns em cadelas com idades compreendidas entre os 5 e os 10 anos.

O diagnóstico de tumor mamário tende a ser realizado mais precocemente em raças de maior porte (Sorenmo et al., 2013). Por exemplo, no estudo de Itoh et al. (2005) a idade média das cadelas de raça pequena com tumores mamários foi de 10 ± 3 anos enquanto que a idade média dos animais de raças maiores foi de $9,7 \pm 3,5$ anos.

1.3.2. Hormonas e fatores de crescimento

A estimulação hormonal aumenta o risco de tumores mamários em cadelas, tal como nas mulheres. Existe acordo geral quanto ao facto de que a situação mais benéfica é não permitir que a cadela entre em cio, sugerindo que os efeitos cancerígenos das hormonas ováricas decorrem no início da vida do animal durante o desenvolvimento e maturação da glândula mamária (Sorenmo et al., 2013). A OVH realizada antes dos 2 anos de idade reduz o risco de aparecimento de neoplasia (Euler, 2011). O risco de desenvolvimento de tumores malignos em cadelas sujeitas a OVH antes do primeiro estro é de 0,5%. Caso o procedimento cirúrgico tenha sido realizado entre o primeiro e o segundo estro existe um risco na ordem dos 8% e, nas situações em que foi realizado entre o segundo e o terceiro estro, o risco de desenvolvimento de tumor mamário aumenta para os 26% (Schneider, Dorn & Taylor, 1969). Não está

documentado que os animais beneficiem do efeito benéfico da esterilização após o terceiro estro (Sorenmo et al., 2013).

O estrogénio e a progesterona estimulam o tecido glandular mamário e existem recetores para ambas as hormonas tanto no tecido mamário normal como no tecido mamário neoplásico (Kustritz, 2007). Os tumores mamários podem ser avaliados pela sua expressão de recetores de estrogénio e progesterona. A maioria dos tumores benignos são positivos para ambos os recetores sendo mais suscetíveis a alterações no seu tamanho e textura na altura do estro. Nos tumores agressivos não se verificam este tipo de alterações (Murphy, 2008).

Animais tratados com progestagénios contraceptivos apresentam um risco mais elevado de desenvolvimento de neoplasias mamárias. Fármacos constituídos por baixas doses de progestagénios aumentam o risco de tumores benignos. Caso sejam compostos por estrogénios e progestagénios tendem a induzir tumores malignos (Sorenmo et al., 2013).

Tendo em conta o seu papel como reguladores do crescimento e da proliferação celular, os fatores de crescimento têm um importante papel na promoção tumoral.

Pelo crescente destaque na investigação do cancro da mama em mulheres, a expressão dos recetores do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), como promotor de tumores mamários em cadelas, tem sido objeto de vários estudos. Tendo em conta o prognóstico desfavorável dos tumores HER-2-positivos e a possibilidade de adoção de uma terapêutica específica anti-HER-2, a determinação do *status* dos tumores é frequentemente realizada na mulher (Gutierrez & Schiff, 2011). Este fator é sobre-expresso na ordem dos 25% em cancros da mama e está associado a um pior prognóstico (Klopfleisch et al., 2011). Estudos estatísticos demonstraram que o gene associado está amplificado em 15 a 20% das pacientes com cancro da mama. Esta amplificação foi relacionada com o aumento da invasão dos tecidos, metastização e resistência à quimioterapia (Ahn & Vogel, 2012).

Ostrovich et al. (2008) demonstraram, em ratinhos, que a exposição parácrina do epitélio mamário a fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) (sobre-expresso) conduz a hiperplasia mamária, desenvolvimento tumoral espontâneo e aumento da suscetibilidade celular a químicos carcinogéneos. Aumentos crónicos de concentrações de insulina suprimem a formação de proteínas de ligação do fator de crescimento tipo insulina (IGF). Este, livre e em elevadas concentrações na circulação sanguínea, atua como promotor de crescimento tumoral através da supressão da apoptose de celular de células tumorais (Weeth et al., 2007).

Kato et al. (2006) estudaram o significado clínico do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) presente no sangue de canídeos com tumores mamários e observaram que uma maior malignidade tumoral, tal como a ocorrência de metastização pós-cirúrgica, são acompanhadas

por uma elevação dos níveis séricos de VEGF. Lavallo, Bertagnolli, Tavares e Cassali (2009) comprovaram os resultados dos autores anteriores, afirmando que o aumento de expressão de VEGF nos tumores mamários caninos está associado a um risco mais elevado de desenvolvimento tumoral e metastização.

1.3.3. Suscetibilidade genética e genes supressores de tumores

Através da observação de casos de cancro da mama, foi fundamentada a hipótese que envolve certas alterações no sistema de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) na carcinogénese de tumores mamários caninos. Em cadelas, especialmente nos casos em que se verifica metastização, os tumores são caracterizados por um padrão de genes reparadores do ADN que apresentam instabilidade genética. Esta situação poderá ser causada pelo *stress* gerado pela replicação por divisão aberrante, hipóxia, mutações cumulativas e alterações epigenéticas (Klopfleisch et al., 2011).

Os tumores mamários, tanto na cadela como na mulher, são uma entidade clínica complexa e multifatorial com interligação entre fatores genéticos e ambientais. Os genes de risco mais estudados têm sido os seguintes: *breast cancer type 1 susceptibility gene* (BRCA1), *breast cancer type 2 susceptibility gene* (BRCA2), *tumour protein p53* (TP53), *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), *checkpoint kinase 2* (CHEK2) e *ATM serine/threonine kinase* (ATM).

Nos canídeos, os 4 primeiros estão envolvidos no desenvolvimento tumoral. Os genes BRCA1 e BRCA2 foram associados a tumores mamários existentes em animais de raça English Springer Spaniel (Borge et al., 2011). A existência de mutações nestes genes perfaz 5% a 10% dos casos de cancro da mama na mulher está relacionada com 85% de risco cumulativo de desenvolvimento de tumores mamários (Sorenmo et al., 2013). Verifica-se uma prevalência elevada de mutações no gene BRCA1 em mulheres com história familiar de cancro da mama (Im et al., 2013). Nos estudos de Enginler et al. (2014) e de Borge et al. (2011) foram detetadas mutações pontuais nos genes BRCA1 e BRCA2 que os autores sugerem estarem associados com o desenvolvimento de tumores mamários.

Apesar do papel do BRCA1 na patogenia dos tumores mamários caninos não ser clara, os seus níveis de expressão e a sua localização variam consoante o animal apresenta, ou não, lesões tumorais. A perda de função do BRCA1 leva a instabilidade biológica com controlo anormal do ciclo celular, apoptose e tumorigénese (Im et al., 2013). As proteínas BRCA2 têm um papel importante na manutenção da estabilidade genómica, recombinação do ADN e reparação da cadeia dupla. As células que apresentam deficiência neste tipo de proteínas exibem uma

instabilidade genômica característica, sugerindo que estes compostos possuem uma função supressora no desenvolvimento tumoral (Enginler et al., 2014).

Um dos genes supressores de tumores e inibidores de crescimento mais caracterizados é o gene TP53. A transcrição deste gene dá origem à proteína p53, que sofre ativação com *stress* oxidativo ou lesão no ADN e altera o ciclo celular. O impacto dos níveis de expressão de p53 pelas células dos tumores mamários caninos tem vindo a ser intensamente estudado, contudo, o seu valor prognóstico ainda se encontra em debate. Existe outra proteína, a p21, que é sobre-expressa em carcinomas caninos metastáticos (Klopfleisch et al., 2011).

O PTEN é outro gene supressor de tumores com interesse prognóstico nos tumores mamários caninos. A sua perda da sua expressão foi associada, em 76% dos animais com tumores malignos, a um tempo de sobrevida inferior (Klopfleisch et al., 2011).

1.3.4. Ciclooxygenases

A sobre-expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2) tem sido especialmente observada em tumores mamários agressivos. Os mecanismos através dos quais a expressão de COX-2 contribui para um pior prognóstico não foram completamente elucidados, porém, a expressão tem sido relacionada à capacidade de invasão tumoral. A inibição da apoptose, a supressão do sistema imunológico e a indução de angiogénese pelas vias relacionadas com a COX-2 têm sido igualmente descritas em medicina humana (Queiroga, Pires, Lobo & Lopes, 2010). Relativamente à expressão de COX-2 em tumores mamários humanos, foi referido que 40 a 50% dos carcinomas mamários invasivos apresentam um elevado nível de expressão. A COX-2 é igualmente sobre-expressa em tumores mamários malignos de cadela. A sua expressão é superior em carcinomas do que em adenomas. Certos tipos específicos de neoplasias mamárias como os carcinomas túbulo-papilífero, anaplásico, inflamatório e de células escamosas apresentam uma expressão mais elevada de COX-2 (Doré, 2011). Em modelos animais, o tratamento com inibidores seletivos da COX-2 reduziu o crescimento e metastização de tumores induzidos experimentalmente, indicando um papel emergente destes fármacos na prevenção e tratamento de neoplasias (Queiroga et al., 2010).

1.3.5. Dieta e condição corporal

A obesidade foi sugerida como um fator que reduz o tempo de latência das neoplasias mamárias e aumenta a sua incidência de desenvolvimento. O peso corporal excessivo durante a puberdade aumenta o risco de desenvolvimento de tumor mamário (Sorenmo et al., 2013). A obesidade ao

ano de idade e a obesidade existente um ano antes do diagnóstico de nódulos mamários foi relacionada com maior prevalência de tumores e displasias mamárias (Murphy, 2008).

O consumo de comida caseira tem sido associado com o aumento do risco de desenvolvimento lesões ao nível da mama (Euler, 2011). Um elevado *intake* de carne vermelha, especialmente vaca e porco, foi considerado como fator de risco para o desenvolvimento tanto de lesões neoplásicas como de displasia da glândula mamária (Sorenmo et al., 2013).

O tecido adiposo é uma importante fonte de estrogénio devido à sua capacidade de aromatização que converte androgénios em estrona que, por sua vez, é convertida em 17 β -estradiol (Cleary, Grossman & Ray, 2010; Sorenmo et al., 2013). Desta forma, o tecido adiposo mamário contribui para o aumento da exposição da glândula mamária ao estrogénio.

Adicionalmente, a expressão dos recetores de leptina, uma proteína sintetizada no tecido adiposo, tem sido verificada em várias células do organismo nomeadamente células cancerígenas. Estes recetores foram identificados em certos tumores mamários humanos (Cleary et al., 2010). A leptina foi ainda identificada como um promotor de culturas de células tumorais mamárias de humanos (Weeth et al., 2007).

1.4. Diagnóstico e estadiamento

1.4.1. Apresentação clínica e diagnóstico

A suspeita inicial de tumor mamário constrói-se com base na informação do paciente (idade, altura da OVH), história clínica (duração dos sinais clínicos, ciclos reprodutivos, lactação, terapêutica com progestagénios), estado geral e exame físico. Por vezes, os donos fazem referência a pequenos tumores presentes há algum tempo e que, repentinamente, aumentaram de dimensão (Sorenmo et al., 2009). Ao exame físico, é importante a realização da palpação das duas cadeias mamárias com o animal em decúbito dorsal. Cada mama deverá ser inspecionada (Sleeckx et al., 2011). Os mamilos podem ser também examinados para avaliar a presença de secreção (Peleteiro, 1994).

Tipicamente, os tumores mamários afetam os dois pares de mamas mais caudais, onde os tecidos e as próprias glândulas são maiores e, por isso, a palpação realizada deverá ser minuciosa de forma a detetar os tumores mais pequenos (Sorenmo et al., 2013). A palpação permite detetar nódulos a partir de 0,5 cm de diâmetro (Peleteiro, 1994) e determina se o tumor se apresenta móvel (no tecido mamário) ou fixo, infiltrando o tecido cutâneo suprajacente ou o tecido muscular subjacente (Euler, 2011). As massas podem variar desde nódulos de poucos milímetros a massas de 10 a 20 cm de diâmetro. A pele poderá apresentar-se ulcerada (Sleeckx et al., 2011). As massas podem ser sésseis ou pediculadas (MacPhail, 2013). Na cadela, são

ainda frequentes os tumores quísticos que se apresentam tensos à palpação. Noutros casos, podem ainda ser palpados pequenos nódulos dispostos em placa (Peleteiro, 1994).

A palpação dos linfonodos tributários é obrigatória. O plexo axilar e os linfonodos mamários só são palpáveis quando aumentados (Sleeckx et al., 2011). Caso se detete hipertrofia dos linfonodos, deverá ser realizada uma punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para averiguar metástases em exame citológico antes de estabelecer a terapêutica a aplicar (Euler, 2011).

Em tumores mais agressivos, como o carcinoma mamário inflamatório, pode ser observado eritema cutâneo e ulceração (Sorenmo et al., 2011). Estes carcinomas são uma entidade clínica rara que pode ser facilmente confundida com mastite ou dermatite severa. Estas lesões afetam toda a cadeia mamária que apresenta edema, inchaço, aumento de temperatura e dor à palpação (Kim et al., 2011; Sorenmo et al., 2011). A maioria dos animais com carcinoma inflamatório apresenta metástases à distância e sinais de doença sistémica, sendo fracos candidatos à terapêutica cirúrgica (Sorenmo et al., 2011; Sorenmo et al., 2013). Foram identificadas duas formas de carcinoma mamário inflamatório: a forma primária que surge repentinamente em animais sem qualquer tipo de lesão mamária tumoral prévia e a forma secundária que implica uma lesão tumoral já existente (Kim et al., 2011).

Em situações de tumores com metastização à distância, os pacientes podem apresentar sintomas inespecíficos como fadiga, letargia, perda de peso, dispneia, tosse, edema ou claudicação. A extensão e localização das metástases determinam o tipo e a gravidade dos sintomas. Apesar dos carcinomas metastizarem principalmente por via linfática para os linfonodos regionais e pulmão, pode haver metastização por via hematogénica. Outros locais menos reportados como alvo de metastização são o fígado, osso, cérebro, baço, rim, pele, olho, glândulas adrenais, útero, coração, tecido muscular e pâncreas (Sleeckx et al., 2011).

É prudente realizar hemograma, bioquímicas séricas e urianálise antes de realizar a cirurgia para despiste de doenças concomitantes ou síndromes paraneoplásicas (Euler, 2011; MacPhail, 2013). A realização de 3 projeções radiográficas torácicas (laterais e ventrodorsal ou dorsoventral) é considerado o *standard* para deteção de metástases ao nível pulmonar (Euler, 2011; MacPhail, 2013; Sorenmo et al., 2011). Existem casos nos quais uma ecografia abdominal para avaliação dos linfonodos mamário e ilíaco medial poderá ser mais apropriada para a deteção precoce de metástases (Euler, 2011). A tomografia axial computadorizada tem-se tornado mais disponível e, por isso, desenvolvido um papel no diagnóstico de metástases à distância, nomeadamente ao nível pulmonar. Com este exame é possível eliminar a sobreposição de estruturas torácicas e, graças à melhor resolução de imagem, possibilita a identificação de pequenos nódulos de difícil deteção. O seu principal problema é a necessidade de anestesia que, além de poder não ser adequada ao estado de saúde do animal, pode gerar

artefactos nas imagens obtidas por consequência da diminuição da capacidade respiratória do paciente (Armbrust et al., 2012).

Os sistemas de estadiamento tornam os registos médicos mais precisos e consistentes permitindo uma comparação de casos eficiente. Sistemas baseados no tamanho tumoral e *status* dos linfonodos podem fornecer alguma informação prognóstica e guiar os clínicos na decisão terapêutica (Sorenmo et al., 2011). O estadiamento tumoral é feito de acordo com o sistema *tumour-node-metastasis* (TNM). A versão original de Owen (1980) foi posteriormente modificada por Rutteman, Withrow e MacEwen em 2001 e hoje em dia é utilizada no estadiamento de tumores mamários (Tabela 1). Relativamente à dimensão tumoral, a medida utilizada é o maior diâmetro encontrado. Quanto ao *status* de presença de metástases dos linfonodos pode ser baseado tanto em resultados citológicos como histopatológicos (Sorenmo et al., 2011).

Tabela 1 – Estadiamento dos tumores mamários caninos.

Estadio	Tamanho tumoral (cm)	Status linfonodos	Metástases à distância
I	T1 (<3)	N0	M0
II	T2 (3-5)	N0	M0
III	T3 (>5)	N0	M0
IV	Qualquer T	N1	M0
V	Qualquer T	Qualquer N	M1

Adaptada de Sorenmo et al. (2013). Legenda: N0 – Linfonodos sem metástases; N1 – Linfonodos com metástases; M0- sem metástases; M1 – presença de metástases.

1.4.2. Diagnóstico citológico

Ao contrário do que se verifica na cadela, na mulher a avaliação citológica pré-cirúrgica é bastante utilizada para determinar a malignidade tumoral e é considerada uma alternativa rápida e pouco invasiva em comparação à técnica de biópsia cirúrgica. Simon et al. (2009) referem ter obtido uma correlação cito-histológica correta de diferentes tipos de tumores mamários caninos em 81% das amostras e 93% de concordância entre a diferenciação entre tumor maligno e benigno. A sensibilidade e especificidade da citologia para diagnóstico de malignidade foi de 86% e 96%, respetivamente (usando a histopatologia como método de referência). Cassali, Gobbi, Malm e Schmitt (2007) obtiveram uma correlação cito-histológica de 67,5% quando considerados todos os exames citológicos e, quando excluídos os exames inconclusivos, a

correlação foi de 92,9%. No estudo de Peleteiro et al. (2009) foi verificada uma correlação citohistológica de 78,57% em 37 amostras de tumores mamários caninos. Contudo, no caso das lesões benignas, só se verificou concordância em 2 dos 5 casos.

A correlação entre os resultados do diagnóstico citológico e histológico é elevada quando apenas se pretende diferenciar se a lesão tem origem neoplásica ou inflamatória. Este tipo de diagnóstico tem maior significado caso haja dúvidas sobre a natureza da lesão neoplásica ou a sua localização seja fora do comum, em situações de recorrência tumoral, quando se verifica hipertrofia dos linfonodos tributários e caso a occisão do animal esteja em causa (Peleteiro & Carvalho, 2011). A citologia dos tumores mamários pode auxiliar à distinção entre lesão neoplásica do foro mamário ou não, como por exemplo mastocitoma cutâneo (Sleekx et al., 2011). A multiplicidade primária, característica das neoplasias mamárias da cadela obriga a uma avaliação individual de cada tumor. Estas lesões apresentam uma marcada heterogeneidade celular, o que complica o seu diagnóstico (Peleteiro & Carvalho, 2011; Simon et al., 2009). Quando o alvo de exame citológico são lesões mamárias quísticas é importante ter em conta que o líquido característico deste tipo de lesões prejudica a fixação e deforma as células, dificultando o exame (Peleteiro & Carvalho, 2011). Lesões com presença de necrose ou inflamação contribuem para a diminuição da exatidão da citologia (Simon et al., 2009).

Para uma correta realização da colheita as massas a aspirar deverão estar identificadas com o local de colheita, características morfológicas relevantes (tamanho, aderência e ulceração) e identificação do animal (incluindo o seu estado reprodutivo). Para massas acima dos 3 cm de diâmetro as amostras são recolhidas de forma representativa realizando aspirações em mais que um local, dando preferência à periferia da massa (Peleteiro & Carvalho, 2011).

A avaliação citológica dos linfonodos tributários apresenta uma elevada sensibilidade na deteção de metástases em animais com tumores sólidos (Sorenmo et al., 2011). Esta análise pode ser muito útil na identificação de metástases regionais contudo não fornece dados sobre o grau de infiltração dos tecidos ou permeação vascular. O prognóstico não deverá depender somente da análise citológica e o diagnóstico de malignidade só poderá ser realizado com a observação de comportamento celular compatível com mau prognóstico (Peleteiro & Carvalho, 2011).

1.4.3. Diagnóstico e classificação histopatológicos

O diagnóstico histopatológico é o *gold standard* para o diagnóstico de lesões tumorais mamárias, sendo a única análise que permite a emissão de um prognóstico preciso (Peleteiro & Carvalho, 2011; Rasotto et al., 2012). Em medicina veterinária, este diagnóstico costuma ser realizado sobre a totalidade do tumor após a sua excisão cirúrgica. Aquando do corte, podem

ser observadas massas sólidas, quísticas ou mistas com ou sem necrose à superfície de corte. Quando o tumor é quístico podem ser encontradas uma ou mais cavidades delimitadas por tecido tumoral e preenchidas por líquido. Os tumores mamários caninos podem apresentar-se calcificados quando ocorre metaplasia óssea ou quando são osteossarcomas. Caso tenham sofrido metaplasia cartilaginosa as zonas afetadas apresentam-se de cor branca hialina característica (Peleteiro, 1994).

Têm sido publicadas várias classificações histológicas de tumores mamários caninos. Ao nível internacional, a primeira referência foi publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1974 e 1976. Esta classificação sofreu modificações dando origem a uma obra dividida em 12 fascículos temáticos por Misdorp, Else, Hellmén e Lipscomb (1999). Mais recentemente foi proposta uma nova classificação por Goldschmidt, Peña, Rasotto & Zappulli (2011). Na Tabela 2 encontram-se as duas classificações histológicas mais recentes. Estes autores consideram alguns tipos de neoplasias como entidades específicas tais como o carcinoma simples cribiforme e o comedocarcinoma que na classificação de Misdorp et al. (1999) estão incluídos no grupo de carcinomas *in situ*. Noutros casos, certas neoplasias descritas previamente como benignas foram consideradas malignas tais como o carcinoma ductal e o carcinoma intraductal papilar. O carcinoma micropapilar e o carcinoma e mioepitelioma maligno, descritos recentemente através da sua identificação por imunohistoquímica (IHQ), foram incorporados na classificação proposta por Goldschmidt et al. (2011). O carcinoma inflamatório foi adicionado como neoplasia maligna epitelial especial.

Tabela 2- Classificações histológicas de tumores mamários caninos.

Segundo Misdorp et al. (1999)	Segundo Goldschmidt et al. (2011)
Tumores Malignos	Neoplasias epiteliais malignas
Carcinoma não-infiltrativo (<i>in situ</i>)	Carcinoma <i>in situ</i>
Carcinoma complexo	Carcinoma simples
Carcinoma simples	Tubular
Carcinoma túbulo-papilífero	Túbulo-papilífero
Carcinoma sólido	Papilífero-quístico
Carcinoma anaplásico	Cribiforme
Carcinomas de tipos especiais	Carcinoma micropapilífero invasivo
Carcinoma de células fusiformes	Carcinoma sólido
Carcinoma de células escamosas	Comedocarcinoma
Carcinoma mucinoso	Carcinoma anaplásico
Carcinoma rico em lípidos	Carcinoma em adenoma complexo ou em tumor misto
Sarcoma	Carcinoma complexo
Fibrossarcoma	Carcinoma e mioepitelioma maligno
Osteossarcoma	Carcinoma misto
Outros sarcomas	Carcinoma ductal
Carcinossarcoma	

Tabela 2 (continuação) - Classificações histológicas de tumores mamários caninos.

Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos	Carcinoma intraductal papilífero
Tumores Benignos	Neoplasias malignas epiteliais – especiais
Adenoma	Carcinoma de células escamosas
Adenoma simples	Carcinoma adenoescamoso
Adenoma complexo	Carcinoma mucinoso
Adenoma basalóide	Carcinoma rico em lípidos
Fibroadenoma	Carcinoma de células fusiformes
De alta-celularidade	Mioepitelioma maligno
De baixa-celularidade	Carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes
Tumor benigno misto	Variante de carcinoma de células fusiformes
Papiloma ductal	Carcinoma inflamatório
Tumores não classificáveis	Neoplasias malignas mesenquimatosas – sarcomas
Hiperplasia/Displasia Mamária	Osteossarcoma
Hiperplasia ductal	Condrossarcoma
Hiperplasia lobular	Fibrossarcoma
Hiperplasia epitelial	Hemangiossarcoma
Adenose	Outros sarcomas
Quistos	Carcinossarcoma - tumor mamário misto maligno
Ectasia Ductal	Neoplasias benignas
Fibrose Focal (Fibroesclerose)	Adenoma simples
Ginecomastia	Adenoma papilífero intraductal
	Adenoma ductal
	Com diferenciação escamosa
	Fibroadenoma
	Mioepitelioma
	Adenoma complexo (adenomioepitelioma)
	Tumor misto benigno
	Hiperplasia/Displasia
	Ectasia ductal
	Hiperplasia lobular (adenose)
	Regular
	Com atividade secretora (lactação)
	Com fibrose interlobular
	Com atipia
	Epiteliiose
	Papilomatose
	Alteração fibroadenomatosa
	Ginecomastia
	Neoplasias do mamilo
	Adenoma
	Carcinoma
	Carcinoma com infiltração epidérmica
	Hiperplasia/displasia do mamilo
	Melanose cutânea do mamilo

Na avaliação histopatológica de neoplasias mamárias caninas os critérios mais importantes para o diagnóstico histopatológico de malignidade dos tumores através da exame microscópica de cortes com coloração com hematoxilina e eosina (H&E) são: o tipo de tumor, o pleomorfismo nuclear e celular, o índice mitótico, a presença de áreas necrosadas, a invasão dos tecidos e permeação vascular por células cancerígenas e metastização nos linfonodos regionais (Goldschmidt et al., 2011).

Os tumores mamários caninos representam um largo espectro de possibilidades histológicas. Muitos animais tanto podem apresentar tumores do mesmo ou de vários tipos histológicos, não obstante, o prognóstico é determinado pela massa de caráter mais agressivo. Em muitos casos, o tumor mais agressivo costuma apresentar a maior dimensão (Sorenmo et al., 2013). Sorenmo et al. (2009) verificaram a heterogeneidade histopatológica (mais que um diagnóstico histopatológico) na mesma lâmina, em diferentes lâminas do mesmo tumor e entre diferentes tumores.

1.5. Prognóstico

1.5.1. Tamanho do tumor

O tamanho do tumor, segundo a classificação TNM, foi proposto como indicador prognóstico para tumores mamários malignos caninos por vários autores. No estudo de Chang, Chang, Chang e Wong (2005) os tumores de diâmetro superior a 5 cm apresentam um maior risco de metastização regional além de estarem associados com menor tempo de sobrevivência após a mastectomia. Num estudo mais recente realizado por Peña, Andrés, Clemente, Cuesta e Pérez-Alenza (2013) foi igualmente verificado que o tamanho tumoral está relacionado com o prognóstico do animal.

A dimensão do tumor é claramente aceite como fator prognóstico, contudo, ainda permanece em debate o tamanho a partir do qual o prognóstico se torna menos favorável (Sorenmo et al., 2011). Canídeos com tumores de diâmetro inferior a 3 cm apresentam uma recorrência tumoral, 2 anos após a cirurgia, na ordem dos 35% e aproximadamente 22 meses de sobrevida. Quando o diâmetro das massas ultrapassa os 3 cm, os valores de recorrência aumentam para 80% e a sobrevida decresce para 14 meses (MacPhail, 2013). Filho et al. (2010) observaram um diâmetro tumoral superior a 5 cm em 64,1% dos casos com metástase nos linfonodos regionais.

1.5.2. Metastização nos linfonodos regionais e à distância

A maioria dos carcinomas metastiza através da circulação linfática nos linfonodos axilares e mamários e pela circulação sanguínea nos pulmões (Euler, 2011; MacPhail, 2013). Certos carcinomas mamários, localizados ao nível das glândulas inguinais, podem apresentar metastização para os linfonodos poplíteos (Euler, 2011). Quando o diagnóstico clínico de tumor mamário é realizado, cerca de 25% a 50% das cadelas com tumores malignos já apresentam metástases torácicas (MacPhail, 2013).

Filho et al. (2010) observaram que em 29,5% das cadelas com tumores mamários malignos foi verificada a presença de metástases nos linfonodos tributários. Em 64 dos 120 casos, foi observada a presença de metastização noutros órgãos, tais como: o pulmão (85,9%), fígado (23,4%), coração (21,9%), rim (20,3%) e glândula adrenal (15,63%).

Szczubiał e Łopuszynski (2011) demonstraram a presença de células neoplásicas em 38,46% dos linfonodos adjacentes a carcinomas complexos e em 56,67% dos linfonodos adjacentes a carcinomas simples. Além disso, acrescentam que apenas as metástases de diâmetro superior a 2 mm em linfonodos adjacentes à glândula com lesão tumoral permitem o prognóstico pós-cirúrgico. Desta forma, a avaliação dos linfonodos tributários é importante não só para o prognóstico, como para selecionar os pacientes que poderão beneficiar da instituição de terapêutica adjuvante. Metástases de diâmetro igual ou inferior a 2 mm não foram associadas como fator prognóstico. De Boer, Van Dijck, Bult, Borm e Tjan-Heijnen (2010) mencionam que o valor prognóstico de metástases ocultas (células tumorais isoladas, micrometástases e macrometástases) permanece indeterminado.

1.5.3. Invasão dos tecidos e permeação vascular

Os animais cujos tumores apresentam invasão dos tecidos subjacentes ou permeação vascular possuem menor tempo de sobrevivência (Murphy, 2008). O crescimento infiltrativo dos carcinomas mamários caninos tem sido documentado como fator prognóstico desfavorável (Rasotto et al., 2012). A disseminação das células cancerígenas foi associada a um estadió tumoral avançado, à presença de células tumorais pouco diferenciadas, a metástases ao nível dos linfonodos tributários e a baixa ou nula expressão de recetores hormonais (Jaillardon, Barthélemy, Goy-Thollot, Pouzot-Nevoret & Fournel-Fleury, 2012). No estudo de Rasotto et al. (2012) foi observada uma prevalência de casos com infiltração do estroma mamário por células neoplásicas. Os autores sugerem que a presença destas células está relacionada com um desenvolvimento tumoral mais rápido e permite a antevisão da permeação vascular. Podem ser

observados êmbolos constituídos por células tumorais nos capilares linfáticos em carcinomas mamários mais agressivos (Rasotto et al. 2012).

1.5.4. Tipo histológico e diferenciação celular

O tipo histológico e o grau de diferenciação dos tumores mamários estão associados à malignidade do tumor e ao prognóstico clínico do indivíduo.

Os carcinomas complexos são exemplo de um tipo de tumor cujo arranjo histológico se assemelha ao da glândula mamária, possuindo células epiteliais secretoras e mioepiteliais. Estas neoplasias raramente metastizam e, com o procedimento de excisão cirúrgica adequado, apresentam um prognóstico bastante favorável (Euler, 2011). No estudo de Rasotto et al. (2012), os carcinomas complexos e os carcinomas originários de tumores mistos benignos apresentam uma baixa tendência de metastização.

Os carcinomas simples são mais agressivos que os complexos e, dentro do grupo dos carcinomas simples, o tipo de arranjo celular aumenta o risco de metastização pela seguinte ordem: tubular, túbulo-papilífero, sólido e anaplásico (Murphy, 2008). A taxa de recorrência tumoral em tumores moderadamente diferenciados é de 68%. Caso a neoplasia seja bem diferenciada, a taxa de recorrência decresce para aproximadamente 24% (Johnson, 2009).

Os casos de cadelas com sarcomas e carcinomas inflamatórios apresentam pior prognóstico (Murphy, 2008). A incidência de sarcomas varia entre 5 a 10% e, na sua maioria, são classificados como osteossarcomas ou fibrossarcomas. Cerca de 75% dos casos de sarcomas sofrem metastização, especialmente por via hematogénica (Euler, 2011). Relativamente aos carcinomas mamários inflamatórios, são considerados o tipo mais agressivo e letal de neoplasia mamária existente tanto na espécie humana como nas cadelas. Apesar da sua baixa incidência são caracterizados por um desfecho clínico fatal, uma vez que a terapêutica cirúrgica aliada à quimioterapia não mostram resultados eficazes (Clemente et al., 2010)

1.5.5. Grau de malignidade histológica

Nos carcinomas mamários, especialmente no carcinoma simples, o grau de malignidade tem significado prognóstico (Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis & Dessiris, 2005; Rasotto et al. 2012). A maioria das classificações é baseada na classificação de Elston e Ellis (1991), utilizada em medicina humana, que envolve uma avaliação semi-quantitativa de três aspetos morfológicos tumorais: a sua constituição tubular, o grau de pleomorfismo nuclear (Elston & Ellis, 1991) e a contagem de mitoses por campo (Sorenmo et al., 2013). Os campos

a observar são os localizados à periferia da lâmina ou os que apresentem maior número de células em mitose (Peña et al., 2013). São atribuídas pontuações aos vários critérios e é feito o seu somatório de forma a determinar o grau de malignidade do tumor (Elston & Ellis, 1991). Após o somatório dos pontos obtidos obtém-se um *score* que corresponderá ao grau de malignidade. Assim, valores compreendidos entre os 3 e os 5 pontos correspondem a tumores bem diferenciados de grau I de malignidade, 6 a 7 pontos a tumores moderadamente diferenciados de grau II e 8 a 9 pontos a tumores pouco diferenciados de grau III de malignidade (Goldschmidt et al., 2011; Peña et al., 2013; Sorenmo et al., 2013).

Tabela 3- Critérios utilizados na determinação do grau de malignidade de carcinomas mamários caninos.

A. Constituição Tubular	1	Superior a 75%;
	2	Moderada (10 a 75%) intercalada com áreas de crescimento tumoral sólido;
	3	Ausente ou mínima (<10%).
B. Pleomorfismo nuclear	1	Núcleo pequeno, regular ou uniforme; presença ocasional de nucléolo;
	2	Variação moderada no tamanho e forma nuclear; núcleo hipercromático; nucléolo visível.
	3	Variação marcada no tamanho nuclear; núcleo hipercromático; um ou mais nucléolos.
C. Mitoses /10 HPF	1	0-9;
	2	10-19;
	3	≥ 20.

Segundo Peña et al. (2013). Legenda: HPF – *High-power field*.

1.5.6. Expressão dos recetores hormonais

A expressão dos recetores de estrogénio (RE) e progesterona (RP) é considerada um fator de carácter prognóstico. Tumores com baixa ou nula expressão destes recetores não respondem à terapêutica hormonal e estão associados a um prognóstico desfavorável. Pelo contrário, tumores com uma expressão positiva apresentam um bom prognóstico (Euler, 2011; Kim et al., 2014). Chang et al. (2009) avaliaram o potencial prognóstico da expressão de RE e RP em tumores mamários caninos e, pelos resultados obtidos, apenas a expressão de RP pode ser utilizada como fator prognóstico da sobrevivência do animal. Kim et al. (2014) verificaram que os carcinomas

positivos para ambos os recetores apresentaram prognóstico mais favorável do que aqueles negativos para RE ou negativos para ambos. Estes autores associaram ao pior prognóstico os tumores sem expressão de qualquer tipo de recetor.

1.5.7. Ciclooxigenases

A expressão de COX-2 tem sido relacionada com fatores prognósticos de caráter desfavorável. Queiroga et al. (2005) referem uma menor taxa de sobrevivência e menor intervalo livre de doença nas cadelas com tumores com mais de 60 ng/g de COX-2. No estudo de Queiroga et al. (2010) foi investigado o valor prognóstico da expressão de COX-1 e 2 através de técnicas de IHQ e só a expressão de COX-2 foi associada como prognóstica, estando significativamente relacionada com a presença de metastização regional, aquando da cirurgia, e com a metastização à distância no período pós-cirúrgico. Os animais com expressão mais elevada de COX-2 apresentaram pior prognóstico com menor tempo de sobrevida e intervalo livre de doença. Lavallo et al. (2009) também verificaram que os pacientes com expressão de COX-2 aumentada têm um menor tempo de sobrevida.

Millanta, Citi, Della Santa, Porciani e Poli (2006) avaliaram a COX-2 como mediador da angiogénese em carcinomas invasivos e o seu papel como indicador prognóstico. A expressão de COX-2 foi correlacionada com fatores prognósticos como o grau de diferenciação celular ou a expressão de HER-2. Foi sugerido que a expressão desta ciclooxigenase está relacionada com um pior prognóstico.

1.5.8. Presença de células inflamatórias

Martín de las Mulas, Millán e Dios (2005) assumem que a presença de infiltrados linfocitários tem um valor prognóstico questionável não sendo possível prever o intervalo livre de doença. Estrela-Lima et al. (2010) afirmaram que a intensidade do infiltrado inflamatório influencia o estadiamento clínico e o prognóstico do paciente. Sheu et al. (2008) observaram que percentagens elevadas de linfócitos T CD8⁺ infiltrados no tumor e um rácio CD4⁺/CD8⁺ diminuído têm valor prognóstico na progressão de tumores da mama em mulheres. Matkowski et al. (2009) concluíram que a análise dos infiltrados tumorais de células inflamatórias apresenta valor prognóstico como um marcador para a metastização nos linfonodos regionais.

Este tema será referido mais detalhadamente no decorrer desta dissertação.

1.6. Terapêutica

1.6.1. Abordagem cirúrgica

A cirurgia é o *gold standard* na terapêutica dos tumores mamários (MacPhail, 2013). Permite o diagnóstico histopatológico e é eventualmente curativa, melhorando a qualidade de vida e modificando a progressão da doença (MacPhail, 2013; Sleeckx et al., 2011). Existem diferentes tipos de procedimentos cirúrgicos (Tabela 4) propostos consoante o estado clínico do animal, dimensão tumoral, localização e preferência do cirurgião (Euler, 2011; MacPhail, 2013). O adiamento da cirurgia não é recomendável, pois o tamanho do tumor é considerado fator prognóstico (Euler, 2011). Deve ser realizada a excisão de todos os tumores e, caso esta não possa ser completada num único procedimento, 3 ou 4 semanas após a primeira intervenção deverá ser agendada uma nova cirurgia (MacPhail, 2013). Caso o tumor apresente um elevado grau de malignidade ou as margens de extirpação sejam insuficientes, poderá ser igualmente necessário repetir o procedimento (Euler, 2011).

Dentro das complicações pós-cirúrgicas destacam-se a dor, inflamação, hemorragia, formação de seroma, infeção, necrose isquémica, auto-traumatismo, deiscência da sutura, edema dos membros posteriores e recorrência tumoral (Macphail, 2013). Stratmann et al. (2008) determinaram a frequência de desenvolvimento de um novo tumor mamário após mastectomia regional. O crescimento de uma nova massa ocorreu em 58% dos animais. Deste grupo, 44 animais foram sujeitos a nova cirurgia para excisão do segundo tumor e, após análise histopatológica, verificou-se que 33 tumores eram malignos (carcinoma em 50% dos casos). Estes autores recomendam ainda a prática de mastectomia unilateral como primeira cirurgia de forma a prevenir situações de recidiva tumoral. Macphail (2013) corrobora esta opinião com o facto de que um único procedimento de mastectomia unilateral é menos demorado e menos traumático quando comparado a múltiplas lumpectomias ou mastectomias simples. Pelo contrário, Horta et al. (2014) concluem que a escolha da técnica cirúrgica não apresenta qualquer efeito sobre o tempo de sobrevida, intervalo livre de doença ou tempo de recorrência tumoral.

Tabela 4 - Técnicas para a terapêutica cirúrgica de tumores mamários, definições e indicações.

Técnica	Definição	Indicações
Lumpectomia	Excisão de uma massa <5mm, com margem envolvente de tecido mamário normal \geq 1cm.	Massas pequenas, encapsuladas, não invasivas à periferia da glândula.
Mastectomia simples	Excisão total da glândula mamária.	Tumor na área central da glândula ou na maior parte da glândula.
Mastectomia regional	Excisão de várias glândulas mamárias na mesma cirurgia.	Tumores múltiplos em glândulas adjacentes na mesma cadeia mamária, ou massas em duas glândulas adjacentes.
Mastectomia unilateral	Remoção completa de uma cadeia mamária.	Tumores dispersos ao longo da cadeia mamária.
Mastectomia bilateral/radical	Remoção completa das duas cadeias mamárias.	Várias massas em ambas as cadeias mamárias. Técnica agressiva, pouco aconselhada e com sutura difícil.

Segundo MacPhail (2013).

1.6.2. Quimioterapia e Radioterapia

A quimioterapia é utilizada na terapêutica adjuvante após a mastectomia ou no tratamento paliativo em animais com carcinoma mamário inflamatório ou metastização avançada. Vários quimioterápicos têm sido testados em cães, mas a maioria dos fármacos não demonstraram resultados satisfatórios ou possuem elevados níveis de toxicidade (Sleeckx et al., 2011). Os quimioterápicos mais utilizados na terapêutica de tumores mamários em humanos são a ciclofosfamida, doxorrubicina, gencitabina e os taxanos. Todos estes têm sido utilizados no tratamento de tumores mamários em cadela (Euler, 2011).

Simon et al. (2006) administraram quimioterapia adjuvante pós-cirúrgica. Os animais sujeitos à quimioterapia não apresentaram diferenças significativas no tempo de recorrência tumoral, de metastização ou de sobrevida. Os autores concluem que a utilização deste tipo de fármacos não leva a uma melhoria do prognóstico.

A utilização de radioterapia pode ser sugerida como terapêutica adjuvante em pacientes cuja excisão tumoral foi incompleta, que apresentem metástases ou que tenham sido diagnosticados com carcinoma inflamatório. Alguns protocolos foram instituídos como tratamento paliativo noutros tipos tumores como carcinoma nasal, linfoma ou osteossarcoma (Sleeckx et al., 2011). A radioterapia, como terapêutica adjuvante em tumores da mama, não tem demonstrado benefícios adicionais quando comparada à cirurgia. Além disso, a localização anatómica das cadeias mamárias conduz a um elevado risco de efeitos secundários indesejáveis (Euler, 2011; Murphy, 2008).

1.6.3. Terapêutica hormonal

A goserelina é utilizada na terapêutica de mulheres com tumores mamários hormono-dependentes. Este fármaco promove a redução dos níveis hormonais a valores próximos do zero (Sleeckx et al., 2011). Lombardi, Florio, Pagnini, Crispino e Avallone (1999) confirmaram a ação deste fármaco em cadelas. Observaram uma diminuição dos níveis de estradiol e progesterona que diminuíram para valores semelhantes aos observados em anestro. Foi igualmente observada uma diminuição no tamanho do tumor

Como as hormonas sexuais estão implicadas no desenvolvimento de tumores mamários na cadela a manipulação hormonal, à semelhança do que acontece em medicina humana, pode ajudar no maneio deste tipo de tumores. O tamoxifeno, como modulador específico dos recetores de estrogénio, tem sido usado com sucesso na terapêutica de tumores positivos a estes recetores. Contudo, na cadela, o tamoxifeno produz efeitos secundários inaceitáveis devido à sua metabolização num composto que se assemelha ao estrogénio (Murphy, 2008). A atividade anti-tumoral que tem sido observada em medicina humana não se reproduz nos ensaios com cadelas. A maioria dos animais é forçada à interrupção da terapêutica por efeitos secundários como edema vulvar, descargas vaginais, incontinência, infeção do trato urinário, piómetra do coto e comportamentos característicos de cio (Euler, 2011; Sleeckx et al., 2011).

Os antiprogestagénios ou antagonistas da progesterona e os moduladores dos RP têm sido investigados no tratamento de tumores mamários da mulher (Sleeckx et al., 2011). Guil-Luna et al. (2011) relacionaram, em carcinomas mamários, o efeito da aglepristona na proliferação e apoptose celular com a expressão de RP. Após o tratamento observou-se a diminuição do índice de proliferação celular em carcinomas mamários RP positivos.

1.6.4. Outras terapêuticas

A excisão cirúrgica de tumores liberta células tumorais para a circulação sanguínea. Hermo et al. (2011) estudaram a administração endovenosa de desmopressina no período pré e pós-cirúrgico em 28 cadelas com tumores mamários. A terapêutica com este fármaco prolongou o intervalo livre de doença e a sobrevida dos animais com carcinomas de grau II e III. Com a administração de desmopressina, há libertação do fator de von Willebrand pelas células endoteliais, inibindo a metastização por redução da aderência de células malignas à microvasculatura.

A utilização de inibidores da COX-2 foi descrita como parte da terapêutica de carcinoma mamário inflamatório (Sleeckx et al., 2011). Queiroga et al. (2010) referem que são necessários mais ensaios de forma a determinar se os inibidores da COX-2 poderão ser úteis como terapêutica adjuvante em casos de elevado risco de desenvolvimento de metástases ou em situações sem terapêutica cirúrgica possível. No estudo de Souza, Toledo-Piza, Amorin, Barboza e Tobias (2009), em 12 casos de carcinoma mamário inflamatório, procurou-se avaliar o efeito do piroxicam comparativamente ao uso de quimioterapia com ciclofosfamida e doxorubicina. Os resultados demonstraram um aumento do tempo médio de sobrevida nos animais tratados com piroxicam e melhorias clínicas evidentes. Alkan et al. (2012) estudaram os efeitos do piroxicam e do deracoxib em linhas celulares de tumores mamários caninos. A administração destes fármacos conduziu à diminuição da proliferação celular e à indução da apoptose contudo, as doses utilizadas foram superiores às toleradas *in vivo*. Não obstante, a aplicação intra-lesional poderá vir a ser uma opção a considerar na prática clínica.

Peruzzi, Mesiti, Ciliberto, La Monica e Aurisicchio (2010) desenvolveram vacinas contra a transcriptase reversa da telomerase e a proteína HER-2 e induziram uma resposta imunitária adaptativa contra estes antigénios tumorais. Estes autores referem a necessidade de mais estudos para introdução desta vacina como terapêutica de tumores mamários caninos.

O bevacizumab (Avastin®) é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo o VEGF. Ao bloqueá-lo, o anticorpo promove uma ação anti-angiogénica anti-tumoral. São necessários mais estudos para testar a sua eficácia no tratamento dos tumores mamários (Sleeckx et al., 2011).

Têm sido desenvolvidos vários fármacos com o objetivo de tentar travar as consequências da sobre-expressão de HER-2 nos tumores mamários. O trastuzumab (Herceptin®) foi o primeiro fármaco desenvolvido para intervir na via do HER-2. É um anticorpo monoclonal humanizado que se liga e inibe o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* através de vários mecanismos (Saini et al., 2011). Singer et al. (2012), através da utilização de linhagens celulares de carcinoma mamário canino, verificaram ligação entre o anticorpo trastuzumab e o epítipo

reconhecido do HER-2. Demonstraram ainda que esta ligação inibiu a proliferação celular. Mais estudos na área serão necessários contudo este poderá ser o primeiro passo na instituição da imunoterapia como terapêutica de tumores mamários em cadelas.

Mais terapêuticas serão abordadas no capítulo da imunologia tumoral.

2. Imunologia tumoral

2.1. Aspectos gerais e história

O sistema imunológico compreende dois tipos de resposta imunitária, a resposta inata e a resposta adquirida ou adaptativa, interligadas através da capacidade da primeira estimular e influenciar a natureza da segunda e através da partilha de mecanismos efetores entre as duas. A resposta inata atua rapidamente, porém, é pouco específica utilizando barreiras como a própria pele e mucosas, o sistema complemento, células fagocitárias e citocinas de forma a regular as células envolvidas. A resposta adquirida apresenta capacidade de memória antigénica, de distinção *self* de *non-self* e de promoção de respostas mais vigorosas à medida que há repetição da exposição a certos antígenos. Neste tipo de resposta estão envolvidos os linfócitos T que se dividem consoante o seu *cluster of differentiation* (CD) e o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) em linfócitos T *helper* (CD4⁺ e MHC II) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺ e MHC I) e ainda em células *natural killer* (NK) e células T reguladoras (Treg). Os linfócitos B produzem anticorpos na resposta humoral, ativam o sistema complemento, aumentam a fagocitose por opsonização de células-alvo e induzem citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Bergman, 2009).

A imunologia tumoral representa a área da imunologia que estuda as interações entre o sistema imunológico e as células tumorais, a biologia do reconhecimento da presença das células tumorais, os diversos mecanismos celulares envolvidos e as estratégias utilizadas de forma a iludir o sistema imunológico (Maia & Cardoso, 2012).

A contribuição da resposta imunológica para o controlo eficaz do desenvolvimento tumoral tem sido um assunto controverso. Paul Ehrlich, em 1909, foi um dos primeiros autores a propor o conceito de que o sistema imunológico tem um papel crítico na proteção do indivíduo numa situação de desenvolvimento tumoral (Chow et al., 2012). A presença de leucócitos em carcinomas mamários em mulheres, observada por Rudolph Virchow, forneceu a indicação duma possível ligação entre a inflamação e o cancro. Contudo, só na última década, surge evidência clara que a inflamação tem um papel importante no desenvolvimento tumoral através da descoberta de mecanismos moleculares subjacentes (Grivennikov, Greten & Karin, 2010). É possível que os mecanismos inflamatórios implicados na indução de cancro em humanos sejam semelhantes aos dos animais domésticos tendo em conta o crescente número de literatura que refere a similitude da expressão genética, dos infiltrados inflamatórios, da expressão de citocinas, quimiocinas e de outros biomarcadores entre humanos e mamíferos domésticos com tumores morfológicamente equivalentes (Morrison, 2012).

Hoje, é claro que os tumores apresentam células inflamatórias em variadas densidades desde infiltrações subtis, somente detetáveis com anticorpos específicos, a inflamações claras visíveis com colorações comuns. Historicamente, estas reações foram associadas à tentativa de erradicação dos tumores e, efetivamente, existe cada vez maior evidência de vários tipos de respostas anti-tumorais. Por volta do ano 2000 já se considerava que a inflamação associada aos tumores possuía um efeito paradoxal de promover a progressão tumoral. A inflamação contribui com moléculas bioativas para o microambiente tumoral incluindo fatores de crescimento que promovem a proliferação celular, fatores que limitam a morte celular, fatores pró-angiogénicos e enzimas que facilitam a angiogénese, invasão e metastização. Adicionalmente, as células inflamatórias libertam radicais de oxigénio ativamente mutagénicos para as células tumorais que as rodeiam (Hanahan & Weinberg, 2011).

A inflamação é um rápido processo que se estabelece em resposta à lesão tecidual para que qualquer tecido ou ADN danificados sejam reparados e se inicie a cura. Durante a inflamação ativa, o microambiente celular é extremamente reativo e instável devido aos efeitos combinados de radicais de oxigénio e azoto, citocinas, quimiocinas, eicosanóides, aldeídos reativos e fatores de crescimento. Qualquer perturbação na homeostasia dos tecidos ativa elementos celulares da imunidade inata (macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células NK) como primeira linha de defesa. Estes iniciam a resposta inflamatória através da libertação de citocinas que sinalizam a proliferação celular, quimiocinas que atraem células inflamatórias adicionais, proteases com propriedades de remodelação da matriz, radicais de oxigénio e azoto que levam à destruição de eventuais agentes patogénicos e, finalmente, a reparação da lesão que os tecidos apresentam. Caso exista falha no controlo da resposta inflamatória aguda pode despoletar-se um processo crónico e surgir um microambiente que poderá favorecer o início de um processo tumoral. Quanto mais tempo a inflamação persista, mais altas são as probabilidades de instabilidade genómica e mutações que conduzem ao processo cancerígeno (Morrison, 2012).

Nas últimas décadas tem sido discutido se o sistema imunológico promove, antagoniza ou se é indiferente ao desenvolvimento tumoral. Trabalhos recentes documentaram que o sistema imunológico contribui para a transformação celular, tanto prevenindo como promovendo o crescimento tumoral além de modelar a imunogenicidade tumoral. Estas diferentes funções podem ser separadas pela sua altura de ocorrência durante a tumorigénese e tipo de transformação tumoral, pelos componentes do sistema imunológico envolvidos e pelos antigénios expressos pelas células tumorais (Mittal et al., 2014).

O normal funcionamento das células depende do controlo da divisão celular. Como resultado de mutações despoletadas por químicos, radiação ou vírus, as células podem dar início a uma divisão celular descontrolada. Uma célula que prolifera descontroladamente poderá dar a

origem a um tumor ou neoplasia (Tizard, 2013). A evolução clássica pode ser dividida em 3 fases: iniciação de células normais suscetíveis, promoção com acumulação de material genético alterado e progressão dessas alterações. A iniciação é caracterizada pela acumulação de alterações genéticas (mutações pontuais, deleções, ampliações, metilações do ADN e rearranjos de genes e cromossomas) que, ao não serem reparadas, conduzem a alterações celulares irreversíveis que persistem. A maioria das células com mutações menores sobrevive contudo, caso a alteração não seja compatível com a sua sobrevivência, sofrem apoptose. Para haver desenvolvimento tumoral, as alterações genéticas deverão resistir aos processos de reparação bem como serem legíveis pela ADN-polimerase (Morrison, 2012). As mutações sofridas pelas células fornecem vantagens de crescimento especiais com respostas mais vigorosas a sinais normais de mitose ou maior resistência a estímulos de indução da apoptose. Na fase de promoção decorre o crescimento das células anteriormente referidas que proliferam como resposta a certos estímulos (Kusewitt & Rush, 2007). Na fase final, a fase de progressão, verifica-se um crescimento substancial da massa tumoral e/ou metastização (nas situações de neoplasias malignas) (Morrison, 2012).

2.2. Antígenos tumorais

As células são identificadas pelo sistema imunológico como *self* quando são antígenicamente normais ou *non-self* quando são antígenicamente estranhas. Para se instalar uma resposta imunológica eficaz é necessária a presença de células apresentadoras de antígenos (APC) que processam e apresentam epítomos originários das células tumorais às células imunes efetoras (Maia & Cardoso, 2012).

Por antígenos tumorais entendem-se as moléculas que contêm epítomos imunogénicos especificamente reconhecidos por linfócitos T ou B (Maia & Cardoso, 2012). Podem ser proteínas, glicoproteínas, glicolípidos ou carboidratos expressos à superfície da célula neoplásica. Incluem antígenos específicos de tumores (TSA), expressos somente nas células tumorais, e antígenos associados a tumores (TAA) presentes tanto nas células normais como nas tumorais (Kusewitt & Rush, 2007; Maia & Cardoso, 2012).

Existem 5 tipos de antígenos tumorais que foram identificados: antígenos relacionados com estadios específicos do desenvolvimento celular, formas mutadas de proteínas celulares normais, sobre-expressão destas proteínas, antígenos relacionados com processos tumorais malignos ao nível testicular e antígenos característicos de tumores de etiologia viral (Tizard, 2013). A identificação dos antígenos tumorais permite a sua utilização no diagnóstico e monitorização dos pacientes nos casos em que ocorre libertação para a corrente sanguínea

permitindo a adoção de métodos de detecção e monitorização não invasivos (Kusewitt & Rush, 2007).

2.3. A resposta inflamatória e o cancro

O microambiente tumoral possui um papel importante na evolução do tumor pois a eliminação de células tumorais pelo sistema imunológico é em parte determinada pela presença de reação inflamatória. Mais de metade da massa tumoral é constituída por células de suporte como os fibroblastos, macrófagos e células endoteliais e os tumores não crescem nem metastizam sem estes elementos. O processo de recruta destas células está intimamente relacionado com a inflamação e certas citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e macrófagos (Tizard, 2013).

O cancro e a inflamação estão ligados por duas vias: intrínseca e extrínseca. A primeira é ativada por mutações que levam a neoplasia nomeadamente a ativação de oncogenes, rearranjos cromossomais ou inativação de genes supressores de tumores. As células que surgem desta forma produzem fatores de transcrição e mediadores inflamatórios dando origem a um microambiente inflamatório que envolve as células tumorais (Tizard, 2013). Quanto à via extrínseca, envolve inflamação prévia que aumenta o risco de desenvolvimento tumoral. Os efeitos combinados de ambas as vias conduzem a uma produção adicional de mediadores que reforça o microambiente inflamatório (Morrison, 2012).

A teoria da vigilância imunológica anti-tumoral propõe que as células e os tecidos se encontram constantemente monitorizados e, que este tipo de vigilância é responsável pelo reconhecimento e eliminação da maioria de células tumorais e tumores na sua fase inicial (Hanahan & Weinberg, 2011; Mittal et al., 2014). A completa destruição de um tumor em crescimento pelo sistema imunológico raramente é apreciada num panorama clínico. Contudo, estudos em ratinho demonstraram casos onde tumores em desenvolvimento são reconhecidos e destruídos pelo sistema imunológico intacto. Pelo contrário, em situações de imunodeficiência, é mais comum o aparecimento de tumores tanto espontâneos como induzidos por agentes carcinogêneos (Bui & Schreiber, 2007).

O conceito de vigilância imunológica pressupõe que as células tumorais são antigenicamente diferentes das células normais e, que numa fase precoce do desenvolvimento tumoral, existem condições que permitem o desencadeamento de uma resposta imunológica no microambiente tumoral. Alguns factos corroboram a existência deste tipo de vigilância imunológica tais como as células tumorais serem antigénicas e o aparecimento de tumores ser mais frequente em pacientes imunodeficientes ou sujeitos a tratamentos imunossupressores. Além disso, em

biópsias realizadas em tumores humanos, foi demonstrado que o tumor possui *tumour-infiltrating lymphocytes* (TIL) ou linfócitos infiltrados no tumor que promovem a lise de células tumorais. Contudo, independentemente da capacidade de vigilância imunológica, é indiscutível que na maioria dos casos as células tumorais se organizam e formam lesões com expressão clínica. Para tal, é necessário que as células escapem ou se evadam à ação controladora da imunidade (Maia & Cardoso, 2012).

Um sistema imunológico intacto consegue prevenir, controlar, modular e, pelo contrário, promover a tumorigênese através de um processo chamado *immunoediting* ou imunoeedição cujo conceito evoluiu da teoria inicial da vigilância imunológica. Este processo é constituído por três fases: eliminação, equilíbrio e evasão (Mittal et al., 2014). A hipótese de *immunoediting* determina um papel ativo do sistema imunológico na eliminação de células tumorais imunogénicas e, um outro papel contrastante, na promoção do crescimento e multiplicação de células tumorais menos imunogénicas. Não se baseia somente na medição da incidência tumoral mas também na diferenciação entre a imunogenicidade das próprias células (Bui & Schreiber, 2007).

A seleção por pressão imunológica ou *immunologic sculpting* consiste na eliminação de células tumorais imunogénicas ou sensíveis à imunidade e na seleção e proliferação de células não imunogénicas ou imunorresistentes. Os tumores utilizam mecanismos de tolerância imunológica, nos quais linfócitos T reativos contra as células tumorais são eliminados ou ativamente neutralizados. Existem mecanismos de tolerância central, ao nível do timo, e mecanismos de tolerância periférica com a eliminação/inativação extra-tímica de linfócitos T maduros. O conceito de ignorância imunológica é outro pressuposto que pode justificar a falta de imunidade anti-tumoral. Neste, assume-se que os linfócitos T nunca foram expostos a antígenos tumorais e, caso surjam alterações que permitam essa exposição, desencadear-se-á a resposta imunológica anti-tumoral (Maia & Cardoso, 2012).

2.4. Componentes celulares do infiltrado inflamatório

As células do infiltrado inflamatório presentes no microambiente tumoral atuam de forma ambígua promovendo ou antagonizando o processo tumoral e os leucócitos intervenientes podem ser encontrados em variadas proporções na maioria das lesões neoplásicas. Num processo inflamatório agudo as células inflamatórias rapidamente desaparecem contrastando com o que acontece em locais de inflamação crónica, onde a presença de células inflamatórias se associa a certas alterações como a fibrose, a angiogénese aberrante e a neoplasia (Hanahan & Weinberg, 2011). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a infiltração crónica

de tecidos neoplásicos por leucócitos promove o desenvolvimento e/ou a progressão de vários tumores epiteliais, contudo, os mecanismos celulares e moleculares implicados na ação pró-tumoral não são completamente conhecidos. Alguns tipos de leucócitos exibem uma ação claramente anti-tumoral porém, outros como os mastócitos, linfócitos B, células dendríticas, granulócitos e macrófagos desempenham ações ambíguas (DeNardo et al., 2009).

As células tumorais exploram sinais provenientes do seu microambiente. As células do estroma como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais produzem interleucinas (IL) 6, uma citocina que promove o crescimento tumoral e a angiogénese. Os macrófagos, mastócitos e linfócitos que infiltram o tumor podem promover crescimento tumoral através da remodelação de tecidos, estimulação da angiogénese e supressão das respostas imunológicas (Tizard, 2013). O desenvolvimento tumoral mamário na mulher é caracterizado por aumentos consideráveis de células inflamatórias no estroma tumoral nomeadamente linfócitos B e T e macrófagos (DeNardo et al., 2009).

2.4.1. Linfócitos

Os linfócitos circulam entre o sangue e os tecidos retornando à circulação sanguínea através do sistema linfático. Nos canídeos, foi determinado que o sangue periférico contém aproximadamente 2% do total de linfócitos e a restante população encontra-se em órgãos linfoides como os linfonodos, baço, placas de Peyer e medula óssea. Os linfócitos T perfazem 46 a 72% da população total de linfócitos circulante enquanto que os linfócitos B constituem 7 a 30% (Tizard, 2013). Existe uma população heterogénea de várias subpopulações celulares com diferentes especializações. Dentro dos linfócitos T encontram-se as subpopulações de células T *helper* CD4⁺, células T citotóxicas CD8⁺ e células NK. No grupo das células CD4⁺ encontramos ainda células T *helper* 1 (Th1), células T *helper* 2 (Th2) e células Treg (Simonson & Allison, 2010). É importante diferenciar os vários tipos de linfócitos T pois cada um possui uma função distinta no microambiente tumoral. Enquanto que os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ são responsáveis por lise e morte celular através de variados mecanismos e produtos libertados, os linfócitos T *helper* CD4⁺ são uma classe heterogénea de linfócitos secretores de citocinas que ativam ou inibem outras células, promovendo ou inibindo a resposta imunológica (Gooden, Bock, Leffers, Daemen & Nijman, 2011).

A expressão de proteínas aberrantes e a sobre-expressão de proteínas normais por parte das células cancerígenas suscitam uma resposta inflamatória linfocitária específica (Simonson & Allison, 2010). No cancro da mama na mulher, os linfócitos B e T associados ao tumor possuem um papel tanto na resposta anti-tumoral como na progressão do tumor. Os linfócitos infiltrados

no tumor expressam uma variedade de citocinas que possibilitam ao mesmo tempo a destruição citotóxica do tumor tal como o seu crescimento através da promoção da angiogénese e linfangiogénese locais. Os tumores mamários malignos em cadela são caracterizados por uma infiltração marcada de leucócitos mononucleares, nomeadamente linfócitos, no estroma que rodeia as células tumorais e os vasos. Tal situação contrasta com o observado em tecido mamário normal e em tumores benignos, onde raramente é observada infiltração linfocitária. No cancro da mama, a população dominante de TIL são os linfócitos T. A infiltração por estas células apresenta maior extensão nos carcinomas de maior malignidade e a infiltração por linfócitos B predomina nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral. Podem ser ponderados certos paralelismos entre o papel dos linfócitos T em carcinomas mamários de cadelas e carcinomas de elevada malignidade na mulher, visto os carcinomas mamários caninos se apresentarem geralmente de elevada malignidade devido ao seu diagnóstico tardio (Kim et al., 2010).

Quando ativados, os linfócitos T CD8⁺ são citotóxicos e a sua principal função centra-se na lise celular (Simonson & Allison, 2010). São elementos importantes na resposta imunológica adaptativa celular destruindo células tumorais com moléculas MHC I que apresentam antígenos associados aos tumores. Esta interação promove a produção de interferão *gamma* (IFN- γ) que conduz, indiretamente, à inibição do ciclo celular, apoptose, inibição da angiogénese e indução da atividade tumoricida dos macrófagos (Mahmoud et al., 2011).

Os linfócitos T CD4⁺, ao diferenciarem-se em linfócitos T *helper*, são responsáveis pelas citocinas que coordenam as respostas imunológicas celular e humoral. Poucos estudos avaliaram o impacto desta subpopulação linfocitária na evolução tumoral (Simonson & Allison, 2010). Os linfócitos Th1 têm um papel fundamental na ativação dos citotóxicos CD8⁺. As células Th2 estimulam a imunidade humoral e ativam eosinófilos (Gooden et al, 2011).

As células NK são linfócitos de grandes dimensões que representam cerca de 5 a 15% da população linfocitária. Recentemente, foi referido que o fenótipo canino destas células se apresenta como CD4⁻, CD6⁻ e CD8⁻ (Lin et al., 2010). As células NK encontram-se frequentemente nos infiltrados linfocitários associados ao tumor e o interesse na sua atividade anti-tumoral surgiu com a observação de um crescimento tumoral acelerado em modelos animais com depleção destas células (Simonson & Allison, 2010). São citotóxicas e respondem a células anormais e sob *stress* sem que haja necessidade de exposição primária. Possuem recetores inibitórios que reconhecem moléculas de classe MHC I à superfície da célula alvo, não lesando as que possuem estas moléculas. Apresentam outro tipo de recetores que ativam a sua função citotóxica quando reconhecem proteínas produzidas por células sob *stress*. Assim, as células NK têm dois tipos de alvo nos quais podemos inserir as células tumorais: células que

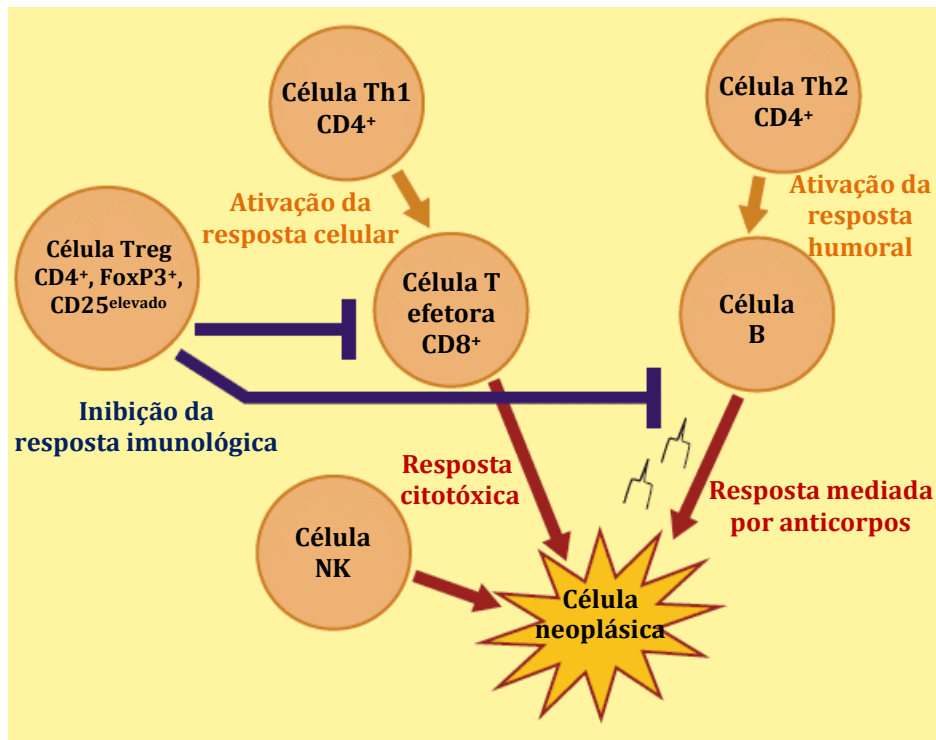
não expressam moléculas MHC I e células que expressam proteínas produzidas em situações de *stress* (Simonson & Allison, 2010; Tizard, 2013). Desempenham um importante papel imunológico pois numa situação em que uma célula neoplásica perca a capacidade de expressão da molécula MHC I, não haverá apresentação antigénica aos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, podendo haver evasão ao sistema imunológico e proliferação das células aberrantes (Simonson & Allison, 2010).

As células Treg são potentes inibidoras da ativação de linfócitos T tanto *in vitro* como *in vivo*. Desenvolvem-se no timo a partir de células T CD4⁺ *naive* e são caracterizadas pela sua elevada expressão de CD25 e a transcrição do fator FoxP3. Apresentam como função principal a regulação das respostas imunológicas através de mecanismos celulares e mecanismos dependentes de citocinas. Protegem os tecidos normais do organismo de reações imunológicas exageradas tendo papel na tolerância aos antígenos do próprio (Simonson & Allison, 2010).

Este tipo de linfócitos produz citocinas como IL-10 e fator de crescimento de transformação β (TGF- β) que inibem a proliferação celular e a produção de IFN- γ . Em certos carcinomas humanos, o número de células Treg encontra-se especialmente aumentado nos focos tumorais e a sua presença é suficiente para inibir a proliferação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos contra as células tumorais (Maia & Cardoso, 2012). Estão presentes em maior número nos tumores mais agressivos ou avançados e um número elevado de células Treg intra-tumorais tende a estar associado a um pior prognóstico em certos carcinomas (Simonson & Allison, 2010). Sasaki et al. (2008) estudaram o valor prognóstico da infiltração de células Treg FoxP3 positivas em carcinoma hepatocelular e observaram um menor intervalo livre de doença em pacientes com contagens mais elevadas destas células. Gao et al. (2007) concluíram igualmente que um maior número de linfócitos Treg está associado a um pior prognóstico. Contrastando com os estudos supramencionados, a associação das células Treg com um melhor prognóstico foi observado por alguns autores em carcinoma gástrico (Haas et al., 2008), carcinoma coloretal (Frey et al., 2010; Salama et al., 2009) e carcinoma do ovário (Leffers et al., 2008).

Cada uma destas subpopulações tem um complexo papel de potenciação ou inibição da resposta imunológica consoante os casos. Na Figura 1 encontra-se esquematizada a forma de interação das várias subpopulações linfocitárias com as células neoplásicas.

Figura 1- Formas de interação das diferentes subpopulações de linfócitos T com a célula neoplásica.



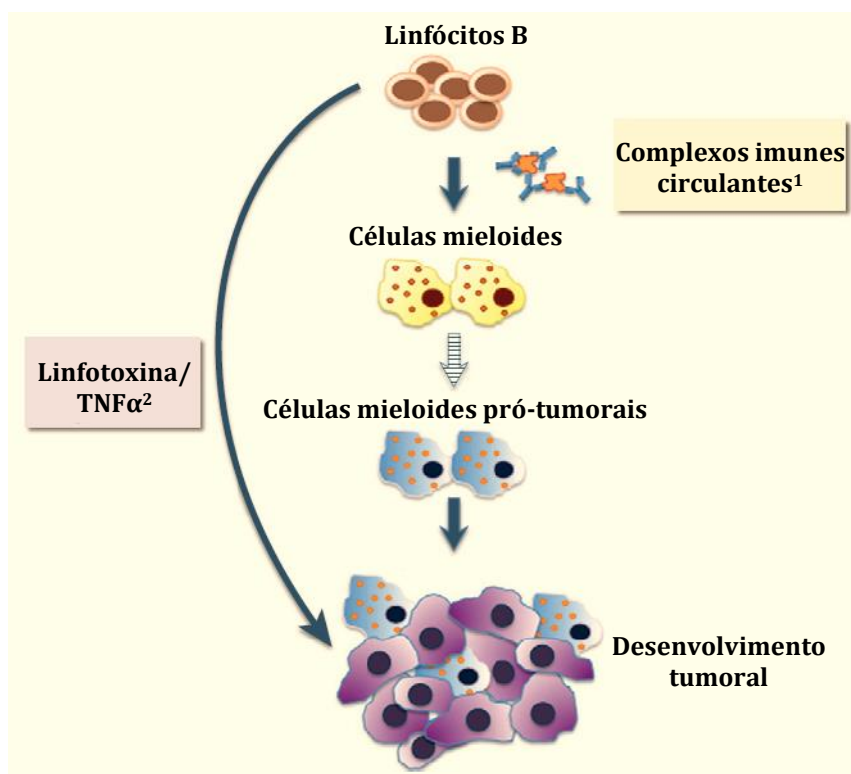
Adaptado de Simonson e Allison (2010).

As primeiras referências à promoção tumoral mediada pelos linfócitos B e respetivos anticorpos surgiram há 60 anos atrás, quando se observou que a transferência de anticorpos específicos para tumores aumentava o crescimento de tumores transplantados e induzidos quimicamente enquanto que, a ausência de células B, limitava esse crescimento (Balkwill, Montfort & Capasso, 2013).

Alguns estudos mais recentes confirmaram o papel pró-tumoral destas células. No estudo de Olkhanud et al. (2010), em ratinhos modelo para cancro da mama, foi observado que uma subpopulação de linfócitos B, nomeadamente linfócitos B reguladores (Breg), promove a metastização ao nível pulmonar. O estudo de Ammirante, Luo, Grivennikov, Nedospasov e Karin (2010), realizado em ratinhos, demonstrou que a linfotóxina proveniente dos linfócitos B está associada ao desenvolvimento de tumores prostáticos resistentes à castração. Schioppa et al. (2011) investigaram os linfócitos B como células promotoras do desenvolvimento tumoral através de mecanismos mediados por TNF- α e concluíram, que em carcinomas de células escamosas induzidos, este fator promove o crescimento tumoral através das células Breg que inibem a resposta imunológica anti-tumoral. Andreu et al. (2010), num estudo com ratinhos modelo para carcinoma de células escamosas, observaram que os linfócitos B e a imunidade

humoral promovem o desenvolvimento tumoral por ativação de um tipo de recetores da imunoglobulina G em células mieloides. Estes complexos antígeno-anticorpo sofrem deposição ao nível do estroma tumoral e contribuem para o recrutamento e diferenciação de macrófagos promotores de tumores. Na Figura 2 encontram-se esquematizados alguns mecanismos de promoção tumoral mediada pelos linfócitos B.

Figura 2- Propriedades reguladoras dos linfócitos B que promovem o crescimento tumoral.



Adaptado de Balkwill et al. (2013) Legenda: ¹ Andreu et al., 2010
² Ammirante et al., 2010; Schioppa et al., 2011.

2.4.2. Neutrófilos

Os *tumour-associated neutrophils* (TAN) podem exercer tanto funções pró como anti-tumorais e, evidências provenientes de modelos animais, sugerem que podem sofrer polarização em dois fenótipos distintos consoante a sinalização tumoral. As citocinas e proteínas armazenadas nos grânulos dos neutrófilos são caracterizadas por possuírem funções ambíguas. Por exemplo, a elastase proveniente dos neutrófilos favorece a proliferação das células neoplásicas epiteliais pulmonares humanas e, pelo contrário, em tumores mamários promove a lise das células tumorais mediada por linfócitos T (Galdiero et al., 2013).

Os neutrófilos promovem a inibição da metastização através da libertação de radicais oxigénio além de potenciarem, como acima referido, respostas imunitárias anti-tumorais por parte dos linfócitos T. Estas ações contrastam com o favorecimento da instabilidade genética e aparecimento de mutações causadas pelos radicais referidos, com a promoção da proliferação tumoral pela elastase libertada, com a promoção da angiogénese através da libertação de VEGF e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), com o aumento da capacidade invasiva das células tumorais através do fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) e de certas citocinas como a oncostatina M (OSM) e, finalmente, com a atividade imunossupressora conseguida através da expressão de arginase promovida pelo TGF- β (Galdiero et al., 2013).

2.4.3. Mastócitos

Os mastócitos recrutam células efetoras para a resposta inflamatória e regulam a inflamação, os processos de remodelação de tecidos e defesa do organismo. Apresentam vários recetores de quimiocinas e fatores de crescimento que, em resposta a estímulos quimiotáticos, conduzem estas células para tecidos inflamados ou com lesões. Em microambiente tumoral os mastócitos situam-se à periferia dos tumores sólidos perto dos vasos sanguíneos. Há estimulação e ativação dos mastócitos pela presença de anticorpos anti-tumorais, hipóxia, citocinas e quimiocinas. Quando ativados libertam, através do processo de desgranulação, histamina, prostaglandinas, leucotrienos, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que são imunorreguladores com uma ação tanto pró como anti-tumoral (Oldford & Marshall, 2015). Os mastócitos libertam heparina, IL-8 e VEGF que promovem a angiogénese tumoral, histamina como imunossupressora, fator estimulante de colónias (SCF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que promovem a divisão celular e proteases que promovem a metastização (Rajput et al., 2008). Estas células são indicadas como alvos de imunoterapia pelas características acima referidas e, como geralmente são consideradas elementos pró-tumorais, a sua inibição tem sido a terapêutica mais sugerida (Oldford & Marshall, 2015).

A infiltração por estas células nem sempre é indicador de pior prognóstico como é o caso dos carcinomas da próstata e da mama (Oldford & Marshall, 2015). Rajput et al. (2008), num estudo com 4444 casos de cancro da mama na mulher, demonstraram que a presença de mastócitos no microambiente tumoral está relacionada com um efeito favorável no prognóstico das doentes. Os mastócitos conseguem inibir o crescimento tumoral pela libertação de peroxidase endógena citotóxica e pela recruta de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos. Secretam IL-1, IL-4, IL-6 e TNF- α que induzem a apoptose de células endoteliais, sulfato de condroitina que inibe

a metastização e catepsinas G que ativam plaquetas, linfócitos e macrófagos além de serem citotóxicas *per se* (Rajput et al., 2008).

A utilização de terapêuticas que aumentem a desgranulação de mastócitos poderá deter efeitos anti-tumorais visto ter sido demonstrado que a histamina contribui para a diminuição do crescimento tumoral (Oldford & Marshall, 2015).

2.4.4. Macrófagos

Os macrófagos são células diferenciadas originárias da linhagem mononuclear fagocítica caracterizados por possuírem características fenotípicas particulares e expressarem certos marcadores (Qian & Pollard, 2010). Estão distribuídos por todo o organismo e as suas funções são afetadas pelos sinais do microambiente no qual estão inseridos. Ao nível dos tecidos, em situações fisiológicas, os macrófagos adquirem diferentes características morfológicas e funcionais. Em situações de resposta a lesão, invasão por microrganismos ou resposta a citocinas produzidas por outras células linfoides, os macrófagos sofrem vários tipos de ativação. Estão presentes nos tecidos tumorais e constituem um dos principais componentes do microambiente inflamatório tumoral. As respostas imunitárias adaptativas anti-tumorais juntamente com as citocinas tumorais e das células do estroma modelam as funções dos macrófagos durante a progressão tumoral (Mantovani & Locati, 2013). Os *tumour-associated macrophages* (TAM) são um componente do infiltrado inflamatório de variados tumores e produzem inúmeros mediadores inflamatórios, nomeadamente quimiocinas, que contribuem para a ativação e manutenção do processo inflamatório crónico (Galdiero et al., 2013).

Foi proposto que os macrófagos estariam envolvidos na imunidade anti-tumoral contudo, Al Murri et al. (2008) e Beck et al. (2009) associaram estas células a maior malignidade tumoral, demonstrando que poderão estar envolvidas no processo de progressão tumoral. As funções pró-tumorais dos macrófagos incluem a cooperação na angiogénese associada ao tumor, a promoção da invasão, migração e entrada em circulação das células tumorais bem como a supressão de respostas imunitárias anti-tumorais. Estudos experimentais em humanos demonstraram que os macrófagos presentes em carcinomas mamários regulam a carcinogénese graças às suas propriedades pró-angiogénicas e contribuem para a metastização pulmonar pela produção de fator de crescimento epidérmico humano (EGF) que aumenta o comportamento invasivo das células neoplásicas (DeNardo et al., 2009). Raposo et al. (2013) associaram positivamente a expressão de VEGF em tumores mamários caninos à presença de TAM o que corrobora o envolvimento destas células na angiogénese deste tipo de tumores.

Os TAM são recrutados por quimiocinas e outras citocinas produzidas pelas células tumorais ou por células do microambiente tumoral (do estroma ou endoteliais). As principais atividades pró-tumorais consistem na produção de fatores inibidores que suprimem a atividade dos linfócitos T anti-tumorais. Estes macrófagos expressam um ligando que regula negativamente os sinais transmitidos através dos recetores das células T acabando por inibir a proliferação e a secreção de citocinas. Por outro lado, os macrófagos são anti-tumorais na medida em que desempenham funções citotóxicas (Maia & Cardoso, 2012).

A plasticidade característica permite que, ao integrarem diferentes tipos de sinalizações, adquiram diferentes fenótipos com polarizações opostas. Citocinas como o IFN- γ dão origem a macrófagos M1 que têm um papel anti-tumoral caracterizado por uma produção significativa de IL-12, radicais de oxigénio e citocinas inflamatórias e pouca expressão de IL-10. Por outro lado, as IL-4 e IL-13 induzem a polarização dos macrófagos em M2 caracterizados por uma elevada produção de IL-10, baixa de IL-12 e fraca capacidade de apresentação de antígenos. Estas células produzem ainda algumas quimiocinas envolvidas no recrutamento dos linfócitos T reguladores, eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2 (Galdiero et al., 2013).

DeNardo et al. (2009), referem que os TAM M2 potenciam o comportamento invasivo das células epiteliais malignas de carcinoma mamário humano através da elevada produção de EGF que ativa os recetores do fator de crescimento epidérmico humano (EGFR) destas células, essenciais para a entrada na circulação sanguínea, disseminação e metastização pulmonar.

Os macrófagos estão envolvidos na angiogénese tumoral pela sua capacidade de produzirem fatores pró-angiogénicos (VEGF e a MMP-9). Em modelos de ratinho com carcinoma mamário, um menor número de macrófagos nos tecidos está relacionado com uma menor angiogénese, aparecimento tardio de sintomas e uma redução de metástases ao nível pulmonar. Além disso os TAM possuem atividade imunossupressora através da sua expressão de arginase, IL-10 e TGF- β (DeNardo et al., 2009).

2.5. Mediadores inflamatórios

Estudos realizados ao longo da última década têm construído uma lista crescente de moléculas com função pró-tumoral libertadas pelas células inflamatórias. Nesta lista encontram-se referidas o fator de crescimento de transformação (TGF), o EGF, fatores de crescimento angiogénico como o VEGF e o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), quimiocinas e citocinas que amplificam a inflamação (Hanahan & Weinberg, 2011).

Todos os tipos de tumor mamário canino aferidos (benigno, maligno ou metástase) no estudo de Kim et al. (2010) apresentaram uma expressão de citocinas superior à do tecido mamário

normal. Estas, juntamente com quimiocinas e fatores de crescimento, desempenham funções essenciais no desenvolvimento e amplificação das respostas imunológicas, assim como na sua regulação. Foram identificados compostos que alteram a mobilização e o desenvolvimento de células inflamatórias afetando a sua viabilidade e funções efetoras acabando por interferir com a imunidade anti-tumoral (Maia & Cardoso, 2012).

A IL-10 inibe a produção de IL-12 e de respostas Th1, interfere com a apresentação de antígenos, inibe respostas induzidas por macrófagos e promove a diferenciação de células Treg. O fator de crescimento de transformação *beta* subtipo 1 (TGF- β 1) inibe a proliferação e expansão de células T induzidas por antígenos, regula a apoptose de linfócitos T e medeia os efeitos supressores de células Treg. O VEGF, é essencial para a angiogénese tumoral e inibe a diferenciação e maturação de células dendríticas, interferindo com o desencadeamento de respostas T específicas contra epítomos tumorais (Maia & Cardoso, 2012).

As quimiocinas possuem um papel importante na progressão tumoral tanto ao nível do recrutamento como no posicionamento dos leucócitos. As quimiocinas como a CCL2 contribuem para a polarização de macrófagos para M2, interagem com células endoteliais e promovem a angiogénese (Bonecchi, Locati & Mantovani, 2011).

A progressão do cancro da mama em mulheres envolve a sinalização entre as células neoplásicas e do estroma. As células tumorais e os TIL produzem citocinas que influenciam o desenvolvimento tumoral. A IL-1 modula o crescimento tumoral e a metastização através do aumento da proliferação celular e, de uma forma indireta, através da promoção da inflamação e da angiogénese (Kim et al., 2010). Estes autores observaram ainda que existiu maior expressão de IL-1 em tumores malignos do que em tumores benignos.

A IL-6 é uma citocina produzida por TIL, monócitos, fibroblastos e certas células tumorais. Neste estudo verificou-se que a expressão de IL-6 pelas células neoplásicas e, em tumores malignos e metástases, foi cinco a seis vezes superior quando comparada à dos tumores benignos. Os autores sugerem que a produção de IL-6 pode estar associada com a malignidade tumoral e a metastização (Kim et al., 2010).

O TNF- α possui atividade anti-tumoral na medida em que elimina as células tumorais e estimula a resposta imunitária do organismo. Contudo, este fator pode induzir a progressão tumoral através do aumento da angiogénese. No estudo de Kim et al. (2010) o TNF- α apresentou maior expressão em tumores malignos.

A IL-4 e a IL-13 regulam o crescimento tumoral por ativação dos respetivos recetores nas células epiteliais. Em algumas linhagens celulares de carcinoma mamário humano estas interleucinas inibem a proliferação celular basal e a induzida por estrogénio em modelos *in vitro*

e *in vivo*. Noutras linhagens, a IL-4 regula a sobrevivência de células tumorais conferindo resistência à apoptose em modelos *in vitro* (DeNardo et al., 2009).

2.6. Imunoterapia antitumoral

A inflamação tem influência na terapêutica utilizada pois vários elementos celulares e mediadores inflamatórios envolvidos podem auxiliar no tratamento dos pacientes. Além disso, as formas convencionais como a quimioterapia e a radioterapia têm como objetivo a morte das células tumorais que, quando lesadas, libertam sinais que estimulam os leucócitos presentes no microambiente tumoral. A eficácia terapêutica destes métodos depende da capacidade celular de apresentação dos antígenos resultantes das células neoplásicas lesadas pelo tratamento aplicado (Chow et al., 2012). Tendo em conta a crescente importância das terapêuticas multimodais, com a utilização conjunta de imunoterapia, é interessante reconhecer o impacto que a quimioterapia apresenta no sistema imunológico. No estudo de Walter et al. (2006), tanto a administração de doxorrubicina (agente quimioterápico único) como do protocolo CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona) não causaram efeitos negativos nos linfócitos T porém, com a administração do referido protocolo, observou-se uma rápida diminuição da contagem de linfócitos B.

A imunoterapia tumoral tem como fundamento a utilização de componentes ou mecanismos do sistema imunológico de forma a eliminar ou neutralizar células e/ou fatores tumorais que facilitam a sobrevivência e proliferação tumoral. Este tipo de terapêutica baseia-se no caráter cognitivo da imunidade adquirida que permite a especificidade das respostas anti-tumorais, na capacidade de gerar memória imunológica anti-tumoral que previne a recidiva tumoral e/ou mantém o tumor em estado de latência e na intensidade e a eficácia da resposta imunológica. Desta forma a imunoterapia tumoral apresenta um elevado potencial terapêutico (Maia & Cardoso, 2012). O objetivo clínico da imunoterapia é a promoção de imunidade anti-tumoral ativa ou passiva (King, Waxman & Stauss, 2008) e pode ser realizada de uma forma ativa com a estimulação do sistema imunológico ou de forma passiva, com a administração de células do sistema imunológico ou dos seus produtos (Tizard, 2013).

Existem várias estratégias de imunoterapia anti-tumoral que utilizam diferentes tipos de resposta imunológica. As formas de terapêutica que utilizam a imunidade celular adquirida dividem-se em 2 grandes grupos: vacinas anti-tumorais e transferência adotiva de células do sistema imunológico (Maia & Cardoso, 2012). A vacinação é uma estratégia eficaz na prevenção de doenças infecciosas, porém, possui menor eficácia na terapêutica anti-tumoral

devido à menor imunogenicidade dos antígenos tumorais e à reduzida imunocompetência dos indivíduos portadores de tumores (King et al., 2008). Têm sido realizados múltiplos ensaios com vacinas de células tumorais, vetores virais e células dendríticas. Estas últimas têm sido alvo de destaque no tratamento de variados tumores através da sua utilização como APC e como fonte dos epítomos tumorais a serem apresentados ao sistema imunológico (Maia & Cardoso, 2012). Bird et al. (2011) testaram uma vacina autóloga de fusão de células dendríticas e células tumorais mamárias cuja administração nos linfonodos poplíteos de canídeos saudáveis levou à produção de IgG que revelaram reconhecer antígenos de células tumorais *in vitro*. Gentshev et al. (2009) utilizaram um vírus oncolítico que infetou e destruiu linhas celulares de carcinoma mamário canino, inibiu a proliferação tumoral, reduziu o tamanho da neoplasia e replicou-se em xenotransplante.

A utilização terapêutica do *Bacillus Calmette–Guérin*, uma estirpe atenuada de *Mycobacterium bovis*, foi inicialmente referida por Owen e Bostock em 1974 e tem sido investigada no tratamento de vários tipos de tumores nomeadamente neoplasias mamárias, carcinomas, osteossarcomas, linfomas entre outros (Bergman, 2009). Henry et al. (2007) estudaram o uso experimental de LDI-100 (um produto que contém a estirpe supracitada de *M. bovis* e gonadotrofina coriônica humana) comparando-o com a vimblastina no tratamento de cães com mastocitoma de grau II e III. As taxas de resposta ao tratamento (representadas pela diminuição da dimensão tumoral em $\geq 50\%$) foram superiores com a utilização de LDI-100 (28,6% contra 11,7%) e apresentaram menor neutropenia iatrogénica. A utilização terapêutica de *Corynebacterium parvum* em medicina veterinária tem sido investigada em vários tumores nomeadamente melanoma e carcinoma mamário (Bergman, 2009).

O derradeiro objetivo da vacinação é a indução de uma resposta imunológica anti-tumoral que resulte numa regressão clínica do tumor e/ou das suas metástases. A resposta à vacinação pode demorar meses devido à lenta indução característica da resposta adaptativa. O agente imunoterapêutico ideal será aquele discrimine entre células tumorais e normais, atinja tanto um pequeno como um grande número de células e tenha a capacidade de prevenir recidivas do tumor, isto é que seja específico, sensível e possua durabilidade (Bergman, 2009).

Quanto à imunoterapia passiva, são referidos 3 formas de terapêutica: administração de citocinas, linfócitos T e anticorpos. No primeiro tipo de terapêutica está descrito o uso de IFN- α , TNF- α , IL-2 e IL-4 em medicina humana com pouco sucesso terapêutico. Em medicina veterinária está descrito o uso de IL-2 recombinante humana com administração local em papilomas e carcinomas vulvares e carcinoma escamoso ocular em vacas. Um dos principais problemas deste tipo de terapêutica são os seus efeitos tóxicos quando se procede à

administração dos compostos nas doses farmacológicas. Quanto à utilização de linfócitos T o método consiste na ativação e desenvolvimento das suas capacidades citotóxicas por exposição a IL-2 durante 4 dias e posterior administração destas células chamadas de *lymphokine-activated killer* (LAK). As células LAK presentes na corrente sanguínea são constituídas por 40% de células NK e 60% de linfócitos T que libertam LAK-1 como molécula efetora proteica citotóxica. Esta indução de células LAK já foi realizada em cão e em gato (Tizard, 2013).

A terapêutica com anticorpos utiliza anticorpos monoclonais contra antigénios tumorais e podem ser administrados por si só ou juntamente com fármacos citotóxicos ou radioisótopos. Existe um anticorpo monoclonal canino contra linfócitos T, o CL/MAb231, que apresenta resultados encorajadores na terapêutica de linfomas em cão (Tizard, 2013).

Os anticorpos monoclonais atuam através de mecanismos que despoletam a apoptose, ativam a citotoxicidade celular dependente de anticorpos, bloqueiam recetores de fatores de crescimento e ativam o complemento. Tem sido registado sucesso clínico na terapêutica com anticorpos monoclonais contra certos alvos nomeadamente o HER-2 com o trastuzumab (King et al., 2008). Romond et al. (2005) referem uma redução em 33% do risco de morte com a utilização de trastuzumab. Infelizmente, a terapêutica com anticorpos possui algumas limitações além do seu custo. Primeiro, caso o sistema imunitário não estabeleça uma memória imunológica, é necessária a administração repetida de anticorpos. Depois, os próprios anticorpos poderão ser imunogénicos (por serem originários de uma espécie diferente) e causar problemas quando se repetem as administrações. Por último, os anticorpos apenas reconhecem proteínas específicas presentes na superfície celular limitando os possíveis alvos (King et al., 2008).

Existem outras estratégias de imunoterapia que são instituídas com o objetivo de reverter a tolerância imunológica ou a imunossupressão que impedem o desenvolvimento ou a atividade de respostas T específicas contra o tumor. O bloqueio da proteína reguladora CTLA-4 ou a eliminação/inativação de células Treg são exemplos deste tipo de terapêutica contudo, o aparecimento de manifestações de autoimunidade costuma estar associado ao efeito anti-tumoral destas terapêuticas (Maia & Cardoso, 2012) o que sugere uma necessidade de estudos futuros para tornar a sua aplicabilidade segura.

Apesar do progresso da imunoterapia tumoral, a eficácia clínica permanece limitada e o sucesso não é muito elevado. Foram identificadas vias e células inflamatórias bem como fatores tumorais que são imunossupressivos e prejudicam a resposta eficaz por parte do sistema imunológico à imunoterapia. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) apresentam um papel amplificador nas várias formas de imunoterapia produzindo efeitos sinérgicos e aditivos (Hussain et al., 2012). Os AINES são uma classe de fármacos utilizados como analgésicos e antipiréticos. Mais recentemente, têm sido usados e estudados pelas propriedades anti-

tumorigénicas e quimiopreventivas. O seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio da síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidónico através da inibição da atividade da ciclooxigenase (Liggett, Zhang, Eling & Baek, 2014) que possui duas isoformas a COX-1 implicada na homeostasia e a COX-2 implicada nos processos inflamatórios e na promoção tumoral (Hussain et al., 2012). Dentro deste grupo de fármacos, o ácido tolfenâmico e o sulfido de sulindac são os mais investigados pelas suas propriedades anti-tumorigénicas (Liggett et al., 2014). Dai et al. (2006), Ulrich et al. (2006) e Pereg et al. (2005) demonstraram em estudos clínicos e pré-clínicos o impacto dos AINES, como agente terapêutico único ou combinado, na redução do risco de cancro e melhoria da taxa de sobrevivência em vários tipos de tumores. Hussain et al. (2012) conclui que os AINES modulam os efeitos pró e anti-tumorais dos TAM, aumentam a citotoxicidade mediada por células NK e promovem a proliferação e função dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ levando à promoção da resposta imunológica anti-tumoral. Acrescentam ainda que os AINES apresentam efeitos sinérgicos com diferentes formas de imunoterapia como as vacinas, a terapêutica com anticorpos monoclonais e citocinas imunoestimuladoras além de provocarem uma depleção de células Treg no microambiente tumoral.

IV. Estudo da resposta inflamatória em tumores mamários de cadela

1. Objetivos do trabalho experimental

A complexa relação entre o cancro e a inflamação têm sido alvo de investigação desde que Virchow observou que certos processos cancerígenos se desenvolvem em locais de inflamação crónica. O papel do sistema imunológico no desenvolvimento tumoral tem sido investigado tanto no Homem como nos animais domésticos, nomeadamente na cadela e na gata.

A contribuição da resposta inflamatória para a promoção ou controlo das células cancerígenas é ainda controversa. Nos últimos anos, tem sido discutido se o sistema imunológico promove, antagoniza ou se é indiferente ao desenvolvimento tumoral. Tem sido procurado atribuir um valor prognóstico aos linfócitos infiltrados no tumor.

O presente estudo teve como objetivos:

- A caracterização histopatológica de todas as massas da região mamária obtidas e associação dos tumores mamários com fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos associados às neoplasias mamárias em cadela;
- Observação e caracterização dos focos da resposta inflamatória associada aos tumores;
- Avaliação da marcação imunohistoquímica de linfócitos positivos aos anticorpos anti-PAX5 e anti-CD3 nos infiltrados linfoides associados aos tumores numa amostragem de 13 carcinomas mamários caninos previamente selecionados;
- Estabelecimento de uma relação entre os dois tipos de imunomarcação;
- Associação dos resultados obtidos com fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos associados às neoplasias mamárias em cadela, tentando inferir sobre fatores determinantes da resposta inflamatória no desenvolvimento neoplásico;

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

2.1.1. Recolha e processamento

Foram acompanhados um total de 25 procedimentos cirúrgicos realizados na clínica Alcabidechevet e no Hospital Escolar da FMV-UL no período temporal em que o estágio decorreu.

Através das fichas clínicas de cada animal, foram recolhidos os seguintes dados: raça, idade, género e estado reprodutivo.

Após excisão cirúrgica do material para análise, este foi colocado em recipiente apropriado com formol tamponado a 10% durante 24 a 48 horas para fixação dos tecidos. Depois, o material foi colocado em recipiente com álcool a 70%. As zonas tumorais a analisar foram selecionadas macroscopicamente por um veterinário patologista (Professor Jorge Correia) e colocadas em cassetes próprias de acondicionamento para processamento pela equipa técnica do Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL. Em alguns casos, após a excisão cirúrgica, o material foi imediatamente cortado e colocado em cassetes e só aí submetido à fixação.

Os fragmentos obtidos foram incluídos em parafina, foram efetuados cortes com micrótomo e finalmente procedeu-se à coloração dos cortes com H&E e montagem das lamelas.

2.1.2. Diagnóstico e exame histopatológico

Deste processo resultaram 19 amostras com origem nos linfonodos mamários e 49 amostras com origem na região da glândula mamária cuja classificação histológica e grau de malignidade se encontram descritos na Tabela 5. A classificação histológica seguiu os critérios da OMS (Misdorp et al., 1999).

A partir da análise do material obtido foi possível identificar: o número e tamanho das lesões, glândulas afetadas, presença de ulceração, necrose, células inflamatórias, permeação vascular, calcificação, diferenciação mesenquimatosa benigna (cartilágnea ou óssea) e metastização nos linfonodos mamários.

Os tumores que apresentam zonas de células tumorais com diferenciação mesenquimatosa benigna de tipo cartilágneo ou ósseo podem apresentar comportamento diferente dos que não apresentam qualquer tipo de diferenciação desse género. Desta forma, é importante o estudo comparativo entre as diferentes situações. Segundo a classificação de Goldschmidt et al. (2011), estes carcinomas constituem um tipo histológico, não obstante, tendo sido utilizada a

classificação de Misdorp et al. (1999), os termos “misto” ou “carcinoma misto” foram utilizados para identificar os casos nos quais se verificaram zonas do tumor com células tumorais com diferenciação mesenquimatosa benigna do tipo cartilágneo ou ósseo.

Tabela 5 - Classificação histológica, frequência absoluta e grau de malignidade das 49 massas da região mamária recolhidas.

		Classificação histológica	FA	Grau de malignidade		
				I	II	III
Tumores mamários	Malignos	CMS Sólido	2	-	-	2
		CMS Tubular	11	4	5	2
		CMS Túbulo-papilífero	2	-	2	-
		CMS Túbulo-papilífero quístico	7	-	5	2
		CMC Sólido	1	-	-	1
		CMC Tubular	5	4	1	-
		CMC Túbulo-papilífero	3	1	1	1
		CMC Túbulo-papilífero quístico	3	1	2	-
		CM de células escamosas	1	-	-	1
	Benignos	AMC Tubular	4			
AMS Tubular		1		NA		
Fibroadenoma túbulo-papilífero		1				
Outros tumores	Malignos	Mastocitoma cutâneo	1	-	1	-
		Hemangiossarcoma	1		NA	
	Benignos	Lipoma	2		NA	
		Epitelioma intracutâneo queratinizante	1		NA	
Lesões não neoplásicas	Hiperplasia fibroadenomatosa	2		NA		
	Quistos foliculares cutâneos	1				
Total			49			

Legenda: FA – Frequência absoluta; CMS – Carcinoma mamário simples; CMC – Carcinoma mamário complexo; CM – Carcinoma mamário; AMC – Adenoma mamário complexo; AMS – Adenoma mamário simples; NA – Não aplicável.

2.2. Imunohistoquímica

2.2.1. Seleção das amostras para imunohistoquímica

O primeiro critério de seleção das amostras a submeter a IHQ foi a reunião das condições de fixação supramencionadas, em caso de não cumprimento, as amostras foram eliminadas das hipóteses selecionáveis.

O segundo critério de seleção foi fundamentado pelas observações resultantes da avaliação histopatológica dos tumores mamários. Durante a referida avaliação, foi observada a presença ou ausência de infiltrado inflamatório linfoide associado ao tumor. Foram consideradas 4 categorias semi-quantitativas de forma a quantificar o infiltrado linfoide em ausente, escasso, moderado ou abundante. As amostras nas quais os infiltrados se classificaram como ausentes ou escassos foram excluídas sendo selecionadas aquelas que apresentavam infiltrados moderados e abundantes.

Nos casos com presença de células inflamatórias linfoides foram ainda observados alguns padrões preferenciais de distribuição do infiltrado linfoide no tumor que não constituíram qualquer critério de seleção: perivascular, marginal (nas margens tumorais e estroma adjacente) e intra-tumoral (na parte central do tumor)

Desta forma, as amostras que seguiram para estudo imunohistoquímico corresponderam a 13 carcinomas mamários, provenientes de 13 animais diferentes, com os seguintes tipos histológicos: carcinoma de células escamosas, CMS túbulo-papilífero quístico, CMC tubular, CMC túbulo-papilífero quístico, CMS tubular e CMS sólido. Com esta seleção procurou-se que a amostragem fosse representativa dos diferentes tipos histológicos dos tumores mamários caninos.

Após a seleção dos casos, foram realizados cortes seriados e, posteriormente, procedeu-se à montagem de dois cortes por cada caso de forma a permitir imunomarcações com cada um dos anticorpos.

2.2.2. Protocolo utilizado

Foi realizado um protocolo que variou apenas quanto ao anticorpo primário como se pode aferir na Tabela 6.

A técnica teve início com a desparafinação através da colocação das lâminas em xilol, seguiu-se a reidratação dos cortes por incubação das lâminas em tinas com concentrações decrescentes de álcool. No fim foram colocadas numa tina com água destilada durante 5 minutos. No decorrer do procedimento supracitado, preparou-se o tampão de lavagem PBS (tampão fosfato-

salino) com pH compreendido entre 7.2 e 7.4. Este tampão foi utilizado para as lavagens das lâminas entre os passos seguintes.

Posto isto, procedeu-se à recuperação antigénica que foi realizada em tampão comercial com pH 9.0, em micro-ondas, durante 5 minutos a 900W seguidos de 15 minutos a 600W. Seguiu-se um período de arrefecimento gradual à temperatura ambiente.

Antes da aplicação do reagente, foi utilizada uma caneta de tinta hidrofóbica Novocastra™ Reagent *Novopen* (Leica Biosystems) para delimitar a área na qual se aplicou a solução. Depois, realizou-se o bloqueio de proteínas com a solução *Protein Block* (kit Novocastra™ Novolink™ *Max Polymer Detection System* - Leica Biosystems). Este passo teve como objetivo o bloqueio dos locais de ligação inespecífica. As lâminas ficaram a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.

No passo seguinte aplicou-se o anticorpo primário. Neste estudo foram utilizados 2 anticorpos diferentes: anti-PAX5 e anti-CD3. Os anticorpos sofreram diluição na proporção mencionada na Tabela 6 com a solução *Antibody Diluent* (Leica Biosystems). O tempo de incubação foi de 60 minutos à temperatura ambiente.

Seguiu-se a inibição da atividade da peroxidase endógena com a solução *Peroxidase Block* (kit Novocastra™ Novolink™ *Max Polymer Detection System* - Leica Biosystems) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para as lâminas a marcar com o anticorpo anti-PAX5, a utilização de peróxido de hidrogénio para bloqueio da peroxidase endógena tem demonstrado um efeito prejudicial no epítipo reconhecido pelo Clone 1EW. É essencial que o bloqueio seja realizado após a aplicação e incubação do anticorpo primário com soluções de metanol e peróxido de hidrogénio em concentração não superior a 3% caso contrário a intensidade da marcação será reduzida.

O passo seguinte compreendeu a incubação dos tecidos com o reagente *Post Primary* (kit Novocastra™ Novolink™ *Max Polymer Detection System* - Leica Biosystems) durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Foi depois aplicado o anticorpo secundário *Novolink Polymer* (kit Novocastra™ Novolink™ *Max Polymer Detection System* - Leica Biosystems) que permaneceu a incubar durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Seguidamente foi aplicada uma solução cromogénica com diaminobenzidina (DAB) a *DAB Chromogen* (kit Novocastra™ Novolink™ *Max Polymer Detection System* - Leica Biosystems), durante 5 minutos. Após este passo, as lâminas foram lavadas em água corrente e contrastadas com Hematoxilina de Mayer durante 30 segundos.

No fim, as lâminas foram imersas em água destilada, os cortes sofreram desidratação através da passagem das lâminas por tinas com concentrações crescentes de etanol finalizando numa imersão em xilol. As lamelas foram montadas com Entellan® sobre as lâminas.

Tabela 6 - Caracterização dos anticorpos primários utilizados e protocolo realizado.

Anticorpo primário	Diluição	Células a identificar	Tipo de marcação	Controlo positivo	Recuperação antigénica
Anti-PAX5 Clone 1EW (LeicaBiosystems)	1/120	Linfoides pró-B pré-B Blásticas B Maduras B	Nuclear	Tônsla de cão	Tampão comercial pH 9.0 Mw: 900W 5min. +
Anti-CD3 Policlonal (Dako)	1/380	Linfócitos T	Citoplasma e/ou Membrana celular		600W 15 min.

Legenda: Mw – Micro-ondas; W – Watt.

As células identificadas através de imunohistoquímica foram classificadas como células com marcação positiva ao anticorpo em questão (anti-CD3 ou anti-PAX5) em vez de classificadas como linfócitos T ou B. A presença do complexo CD3 verifica-se em todos os estadios da célula T (Tizard, 2013) sendo o antigénio detetável nos timócitos precoces ao nível citoplasmático e, com a maturação celular, ao nível membranário. Independentemente do estadio de maturação em que o linfócito T se encontra, este será identificado pela imunomarcação. Pelo contrário, o complexo PAX-5 é um fator de transcrição nuclear específico cuja expressão nos linfócitos B tem início nas células imaturas, ocorrendo em todos os estadios da célula à exceção da fase de plasmócito, na qual deixa de ser expresso (Desouki, Post, Cherry & Lazarchick, 2010. Assim, contrariamente ao que acontece com a marcação dos linfócitos T com o anticorpo anti-CD3, não é possível identificar todas as células pertencentes à linhagem B com o anticorpo anti-PAX5.

2.2.3. Método de contagem das células linfoides marcadas por imunohistoquímica

A contagem das células foi realizada a partir de fotografias digitais (ampliação $\times 400$) obtidas através da utilização da câmara digital Olympus *DP21 Digital Camera* e do microscópio ótico Olympus BX-51. O *software* de contagem utilizado foi o ImageJ 1.47v®.

As fotografias foram realizadas a partir dos campos onde se observou maior densidade de células com marcação positiva. Os campos foram selecionados de forma a não apresentarem espaços vazios, pregas, grandes vasos ou sinais de necrose.

Apesar da observação de padrões preferenciais de distribuição do infiltrado linfóide no tumor, no processo de seleção dos campos a fotografar para contagem não se procedeu à diferenciação pelos locais referidos. Independentemente do padrão de distribuição, os campos foram fotografados desde que fossem considerados campos de maior densidade de células marcadas. Não foram contadas as células não linfóides tais como células tumorais ou outras populações celulares inflamatórias. As células que não se apresentavam na sua totalidade no interior da foto foram rejeitadas. Foram somente contadas as células com marcação indiscutivelmente positiva ou negativa. As células que apresentavam marcação duvidosa não foram incluídas na contagem. A contagem foi realizada apenas pela autora de forma a uniformizar a técnica.

Após as considerações supramencionadas foi contado, em cada um dos casos, um valor mínimo de 1000 células linfóides (positivas e negativas).

Para tal, foram fotografados no mínimo 6 campos distintos, não sobrepostos de forma a evitar a repetição da contagem das mesmas células. Tendo em conta a variação da densidade de células linfóides consoante o carcinoma e sendo necessário um mínimo de 1000 células contadas foi indispensável, em alguns casos, fotografar campos adicionais para perfazer o número necessário de células linfóides. O número de fotografias complementares variou entre 1 e 6.

2.2.4. Avaliação dos resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica

Os resultados da marcação por imunohistoquímica foram avaliados, após a contagem, através de dois parâmetros: a percentagem de células com imunomarcação positiva para cada anticorpo e a densidade linfocitária (número de células marcadas como positivas para cada imunomarcador por unidade de área).

A percentagem de células com imunomarcação positiva para cada anticorpo foi calculada através de:

$$\frac{\text{Número de células com imunomarcação positiva (anti-CD3 ou anti-PAX5)}}{\text{Pelo menos 1000 células linfóides (positivas e negativas)}} \times 100.$$

Para calcular o parâmetro que a autora denomina de “densidade linfocitária” foi utilizada a seguinte fórmula: somatório das células com marcação positiva contadas em 6 fotografias/6. A unidade de área considerada corresponde à área de uma fotografia (ampliação $\times 400$). Como acima referido, o número de fotografias tiradas para perfazer a contagem de pelo menos 1000 células linfoides variou consoante o caso. Com o intuito de uniformizar o número de fotografias utilizadas para a avaliação da densidade linfocitária foi adotado o número de 6 fotografias para cada caso.

Para determinar o valor de células positivas/ mm^2 foi primeiro calculada a área de cada fotografia em mm^2 ($180\mu\text{m} \times 135,65\mu\text{m} = 24417,39\mu\text{m}^2 \approx 0,02\text{mm}^2$) e depois aplicada a seguinte fórmula:
$$\frac{\text{Somatório das células positivas encontradas em 6 fotografias}/6}{0,02}$$

Adicionalmente foi calculado o rácio entre os valores obtidos para a densidade linfocitária para cada imunomarcação.

2.3. Análise estatística

Para realização da análise estatística utilizaram-se os seguintes *softwares*: Microsoft Office Excel® 2013 e IBM SPSS Statistics® 22.

O teste exato de Fisher foi utilizado para aferir a significância das associações presuntivas entre as variáveis categóricas determinadas na análise histopatológica das lâminas.

Foi aplicada a correlação de Spearman de forma a investigar as associações entre:

- Os valores da percentagem de células positivas ao anticorpo anti-CD3 *versus* valores da percentagem de células positivas ao anticorpo anti-PAX5;
- Os valores da densidade linfocitária de células positivas ao anticorpo anti-CD3 *versus* valores da densidade linfocitária de células positivas ao anticorpo anti-PAX5;
- Os valores da percentagem de células positivas ao anticorpo anti-CD3 *versus* rácios dos valores da densidade linfocitária;
- Os valores da percentagem de células positivas ao anticorpo anti-PAX5 *versus* rácios dos valores da densidade linfocitária.

Para a avaliar a associação entre os parâmetros clínicos e anatomopatológicos e os resultados obtidos no estudo imunohistoquímico do infiltrado linfoide foram utilizados os testes de Mann Whitney-U e de Kruskal-Wallis.

Todos os valores médios são apresentados como valor médio \pm desvio padrão.

Em todos os testes foi utilizado o nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1. Caracterização das variáveis clínicas e anatomopatológicas da população com patologia mamária

3.1.1. Caracterização e distribuição etária, rática e do estado reprodutivo das cadelas com patologia mamária

Primeiramente é necessário referir que neste trabalho foram incluídos 25 canídeos, todas fêmeas. No que concerne à idade das cadelas com patologia mamária o valor médio foi de 10,12 ± 2,37 anos. A cadela mais jovem apresentava a idade de 6 anos e a cadela mais velha 15 anos. As raças puras constituíram 44% da amostra identificando-se as seguintes raças: Caniche, Pastor Alemão, Basset Hound, Golden Retriever, Pit Bull e Teckel. Destas, a raça Caniche com 20% dos casos e a raça Pastor Alemão com 8% foram as mais representadas. A maioria dos animais da amostra foi constituída por animais de raça indeterminada que perfizeram 56% do total dos 25 indivíduos.

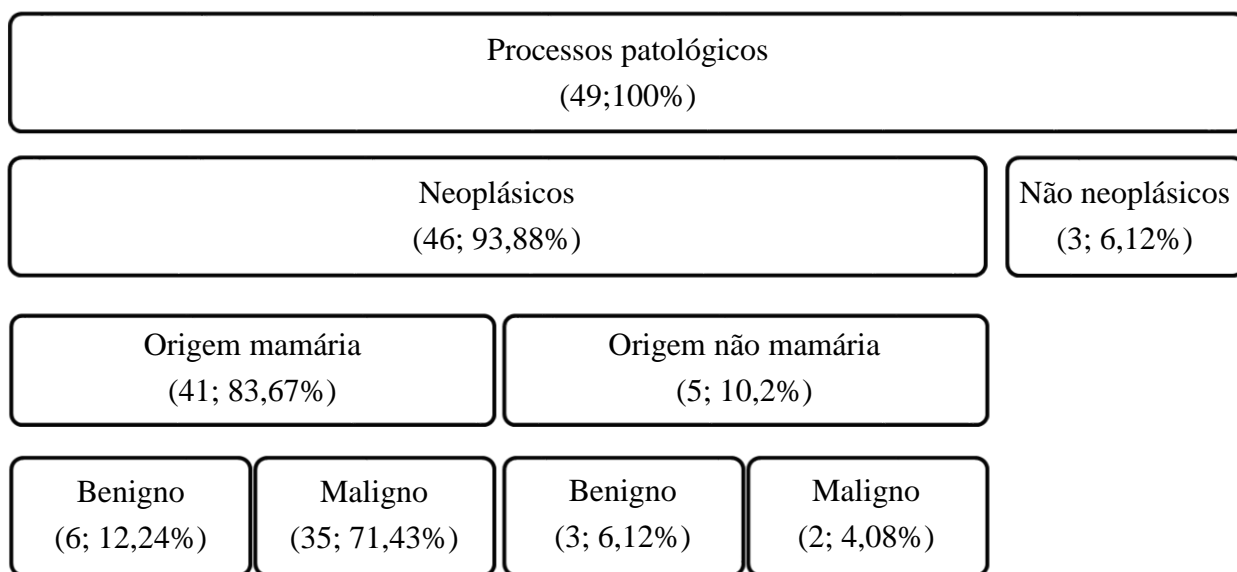
Quanto ao estado reprodutivo apenas 9 (36%) das 25 cadelas foram sujeitas a OVH no período temporal precedente à cirurgia.

3.1.2. Caracterização e distribuição da patologia com origem na região da glândula mamária

Em relação à caracterização e distribuição do tipo de patologia presente na região da glândula mamária verificou-se a existência de situações de neoplasias malignas e benignas com origem na glândula mamária, neoplasias malignas e benignas de origem não mamária e processos patológicos não neoplásicos.

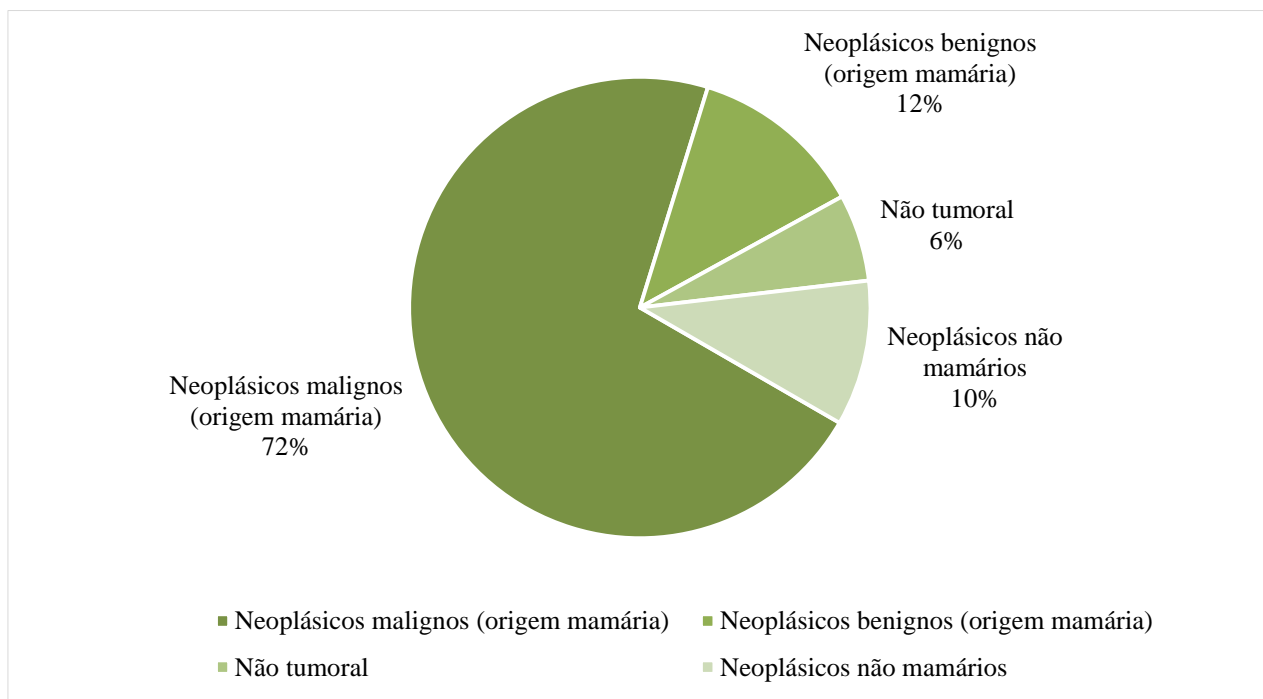
Na Figura 3 e Gráfico 1 encontra-se a caracterização e distribuição da patologia presente. Verificou-se que as alterações neoplásicas são as mais comuns, com 46 casos perfazendo 93,88% do total considerado. As alterações não neoplásicas resumem-se a 3 casos (6,12%) com duas situações de hiperplasia fibroadenomatosa e uma de quistos foliculares cutâneos. Quanto às alterações neoplásicas, aquelas com origem mamária predominam com 41 casos (83,67%) e as neoplasias de origem não mamária são representadas por apenas 5 casos (10,2%), 3 benignos (dois lipomas e um epiteloma intracutâneo queratinizante) e 2 malignos (um mastocitoma e um hemangiossarcoma). Na totalidade de neoplasias de origem mamária, 35 (71,43%) eram malignas e 6 (12,24%) benignas.

Figura 3 – Caracterização e distribuição dos processos patológicos presentes na região da glândula mamária.



Legenda: entre parêntesis encontram-se a frequência absoluta e a frequência relativa com os valores em percentagem.

Gráfico 1- Caracterização e distribuição dos processos patológicos presentes na região da glândula mamária.



3.1.3. Caracterização das neoplasias de origem mamária

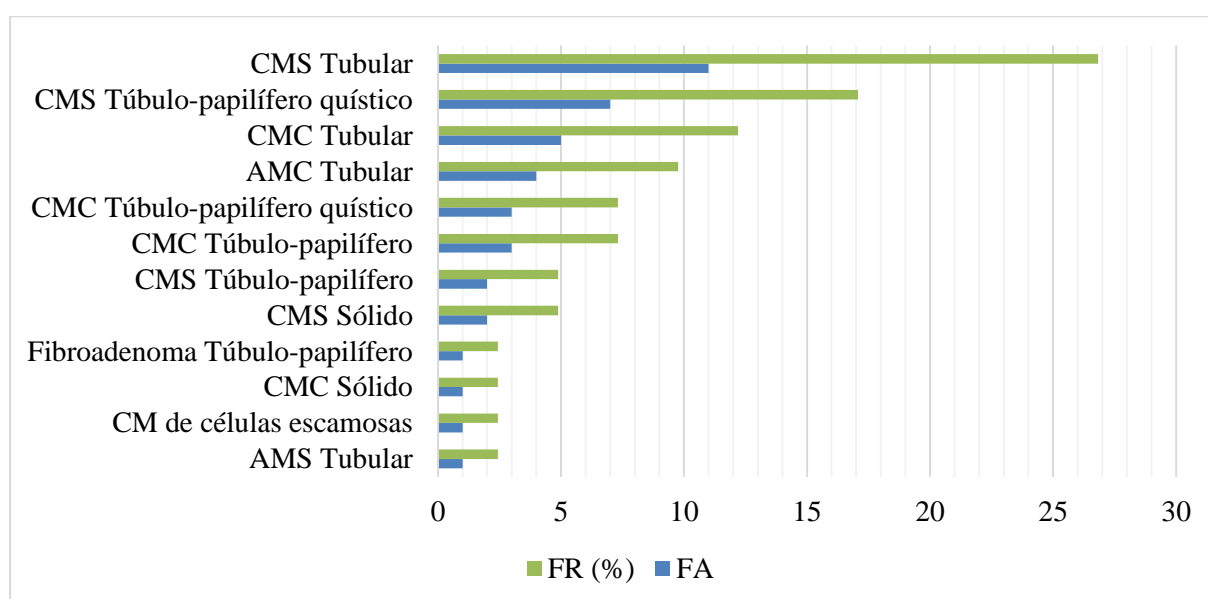
Neste ponto referem-se somente as 41 neoplasias de origem mamária. Às 49 amostras iniciais com origem na região da glândula mamária foram excluídas as lesões não neoplásicas e as neoplasias de origem não mamária.

3.1.3.1. Classificação histológica (n=41) e grau de malignidade (n=35)

De entre os tipos histológicos observados, salientam-se os carcinomas mamários simples (CMS) tubulares como o grupo com maior peso representando 26,83% do total considerado. São seguidos pelos CMS túbulo-papilíferos quísticos com 7 casos (17,07%). No que diz respeito aos tumores benignos destaca-se a presença dos 4 casos de adenomas mamários complexos (AMC) tubulares (9,76%). No Gráfico 2 encontra-se a distribuição das neoplasias de origem mamária consoante a sua classificação histológica.

Relativamente às 35 neoplasias mamárias malignas identificadas, todas elas foram classificadas como carcinomas. No que concerne ao seu grau de malignidade, o grau II foi predominante perfazendo 45,71% do total dos 35 carcinomas, seguido do grau I com 28,57% e do grau III com 25,71%. Todos os carcinomas de células escamosas e sólidos apresentaram grau III, a maioria dos carcinomas tubulares grau I e dos túbulo-papilíferos grau II. Foi identificada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,007$; $n=35$) entre o subtipo histológico e o grau de malignidade tumoral (Anexo 1).

Gráfico 2 – Distribuição das neoplasias de origem mamária segundo a sua classificação histológica.



Legenda: CMS – Carcinoma mamário simples; CMC – Carcinoma mamário complexo; AMC – Adenoma mamário complexo; CM – Carcinoma mamário; AMS – Adenoma mamário simples; FR – Frequência relativa; FA – Frequência absoluta.

3.1.3.2. Tamanho tumoral (n=41)

No que concerne ao tamanho tumoral, foi calculado o valor médio do eixo-maior das lesões para os 41 processos neoplásicos com origem na glândula mamária. Os dados encontram-se resumidos na Tabela 7. Foram ainda consideradas três categorias consoante as dimensões tumorais especificadas na Tabela 8. Foi identificada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,006$, $n=41$) entre os carcinomas e adenomas mamários simples *versus* complexos e o tamanho tumoral. Quando considerados apenas os carcinomas, verificou-se uma associação semelhante ($p=0,046$, $n=35$) (Anexo 1). Em ambas as associações foi verificado que as neoplasias simples apresentavam maior dimensão. Foi encontrada outra associação estatisticamente significativa ($p=0,025$, $n=35$) entre o grau de malignidade dos carcinomas e o tamanho tumoral (Anexo 1). Dentro das lesões de maior dimensão, 3 eram de grau II e 4 de grau III não apresentando um único caso de grau I. Os carcinomas mais pequenos apresentavam-se distribuídos pelas três categorias de malignidade.

Tabela 7- Caracterização da dimensão do eixo-maior dos tumores mamários.

	Valor médio do eixo-maior (cm)	Valor máximo do eixo-maior (cm)	Valor mínimo do eixo-maior (cm)
Tumores mamários (n=41)	2,74 ± 2,57	10	0,2
Tumores mamários malignos (n=35)	3,02 ± 2,66	10	0,2
Tumores mamários benignos (n=6)	1,1 ± 0,98	3	0,4

Legenda: n – Número de casos.

Tabela 8- Distribuição dos tumores mamários pelas categorias de tamanho.

Categorias de tamanho	FA	FR (%)
T1 (<3cm)	27	65,85%
T2 (3-5cm)	7	17,07%
T3 (>5cm)	7	17,07%
Total	41	100%

Legenda: FA – Frequência absoluta; FR – Frequência relativa.

3.1.3.3. Número tumores mamários por animal e sua distribuição pelas glândulas mamárias (n=41)

O número médio de tumores de origem mamária (benignos e malignos) por animal foi de 1,86 \pm 1,96. O número máximo de tumores presentes no mesmo animal foi de 10 e o mínimo de 1 (Figura 4). A moda foi de um tumor mamário por cadela.

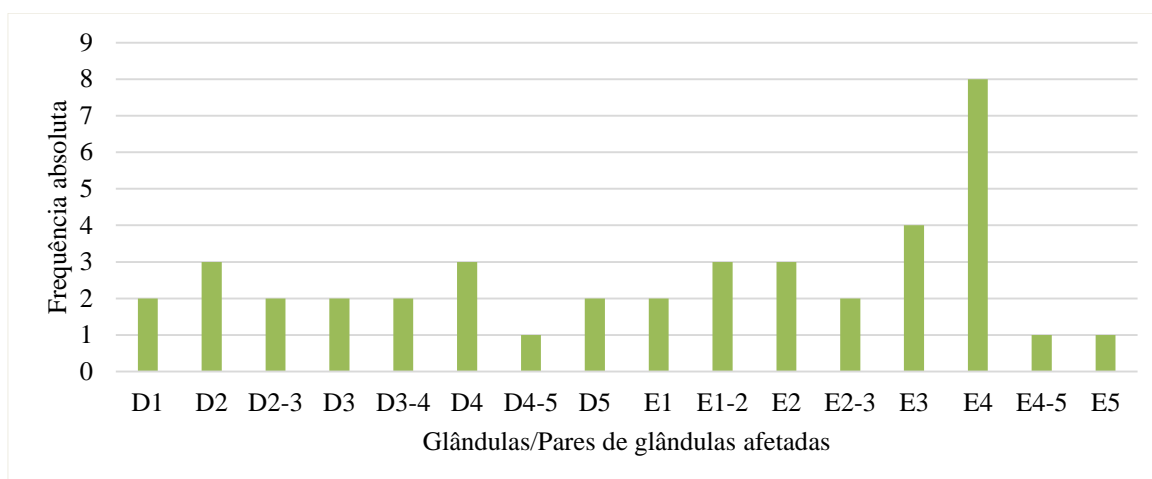
Figura 4- Lesões mamárias de animais incluídos neste estudo.



No que respeita à localização anatômica das mamas lesadas, verificou-se uma diversidade acentuada com lesões identificadas em todas as mamas e, em vários casos, afetando duas glândulas em simultâneo.

Em relação à distribuição das neoplasias, a cadeia mamária esquerda foi a mais afetada apresentando 24 das 41 amostras tumorais de origem mamária. Quanto à distribuição por glândula, a mama E4 (abdominal caudal esquerda) e E3 (abdominal cranial esquerda) foram as mais afetadas constituindo respetivamente 19,51% e 9,76% do total. Quando considerando somente as 35 neoplasias malignas de origem mamária, a glândula E4 foi a mais afetada (17,1%). No Gráfico 3 encontra-se a distribuição dos tumores mamários segundo a localização das lesões observadas.

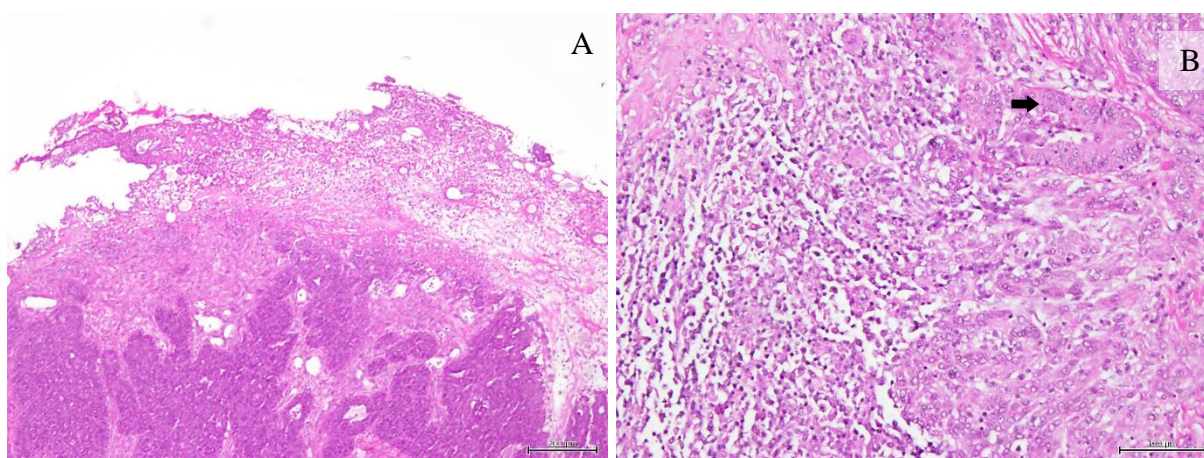
Gráfico 3- Distribuição dos tumores mamários consoante a localização da lesão.



3.1.3.4. Presença de ulceração, calcificação, necrose, diferenciação mesenquimatosa benigna, permeação vascular e metastização nos linfonodos (n=41)

A presença de ulceração, calcificação, necrose, permeação vascular e metastização nos linfonodos não foram achados muito frequentes na amostra. Relativamente à necrose (Figura 5) foi encontrada em 4 casos (9,76%). Foi encontrada calcificação distrófica num caso de carcinoma simples de grau III e a presença de ulceração (Figura 5) foi observada apenas em 2 casos (4,88%). Tanto a presença de permeação vascular como a presença de metastização ao nível do linfonodo mamário foram diagnosticadas apenas num caso (Figura 6). A observação de diferenciação mesenquimatosa benigna (cartilaginosa ou óssea) verificou-se em 8 casos perfazendo 19,51% da amostra considerada.

Figura 5 – Lesões de ulceração e necrose.

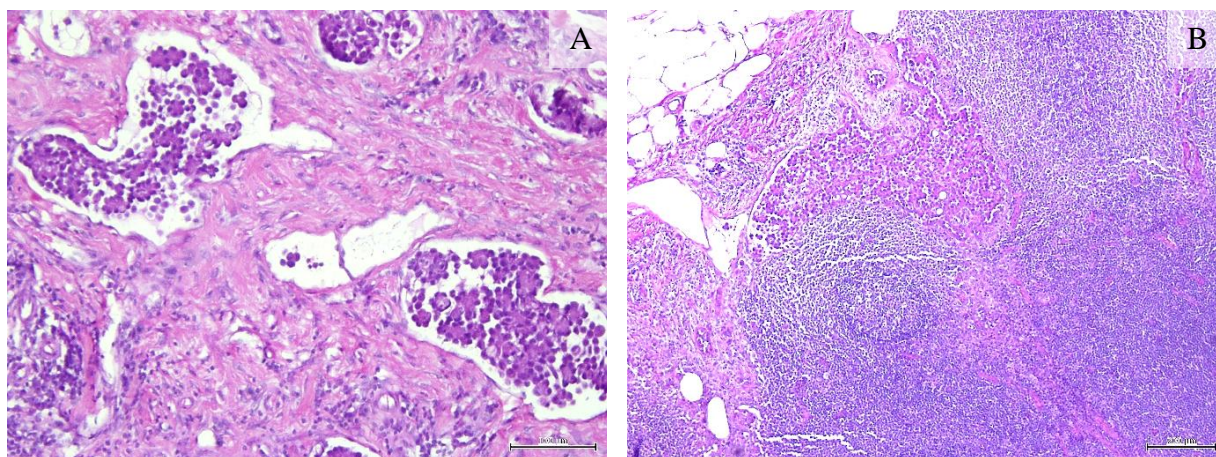


Legenda:

A – Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau III com lesão de ulceração (H&E, $\times 40$).

B – Carcinoma simples tubular de grau III no qual se observa necrose e polimorfonucleares neutrófilos junto às células tumorais (seta) (H&E, $\times 100$).

Figura 6- Permeação vascular e metastização regional.



Legenda:

A – Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau III com permeação vascular (H&E, $\times 100$).

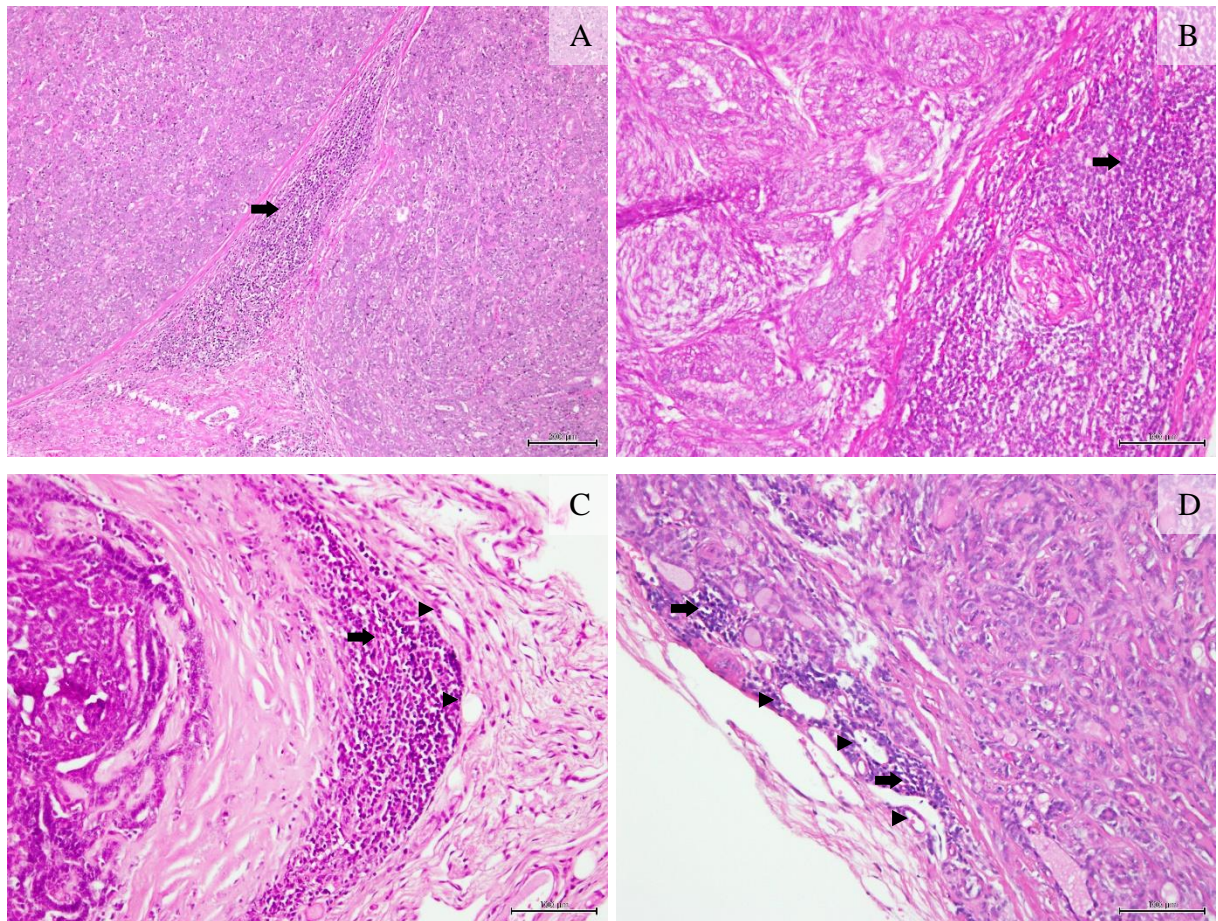
B – Linfonodo mamário com lesão de metastização de carcinoma mamário (H&E, $\times 40$).

3.2. Estudo da resposta inflamatória em tumores mamários de cadela

3.2.1. Estudo da resposta inflamatória presente nas lâminas com coloração H&E (n=41)

Parte do estudo da resposta inflamatória foi realizada durante a análise histopatológica das lâminas com coloração H&E. Foram identificadas diferentes populações celulares inflamatórias que infiltravam os tumores. Os linfócitos, identificados pelas particularidades morfológicas, caracterizaram-se pelo elevado número em infiltrados facilmente observáveis. As distribuições do infiltrado linfóide foram caracterizadas como perivascular, marginal e na parte central do tumor ou intra-tumoral (Figura 7). A observação dos linfócitos localizados entre as células tumorais foi facilitada com a utilização da técnica de imunohistoquímica.

Figura 7- Locais de distribuição do infiltrado linfóide.



Legenda:

A - Carcinoma mamário de células escamosas de grau III com infiltração linfóide entre dois nódulos tumorais (seta) (H&E, $\times 40$).

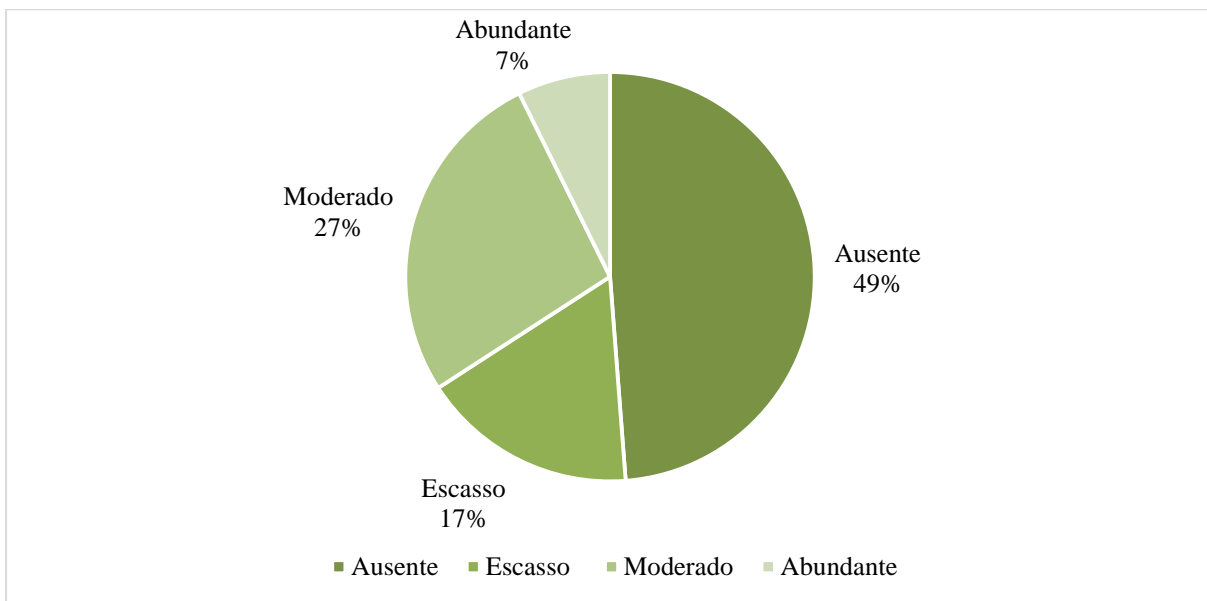
B- Carcinoma complexo tubular de grau I com infiltração (seta) à periferia do tumor (H&E, $\times 100$).

C - Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau II com infiltração linfóide à periferia do tumor (seta) junto a vasos linfático (pontas de seta) (H&E, $\times 100$).

D- Carcinoma complexo tubular de grau II com infiltração linfóide perivascular (setas). Observam-se alguns vasos (pontas de seta) à periferia do tumor (H&E, $\times 100$).

A presença de infiltrado linfoide registou-se em 21 (51,22%) dos 41 tumores mamários considerados. Como já referido, foram estabelecidas 4 categorias semi-quantitativas de forma a quantificar o infiltrado linfoide: ausente, escasso, moderado e abundante. Os casos sem infiltrado perfizeram 48,78% do total. Seguiram-se 11 casos (26,83%) com infiltração moderada, 7 (16,66%) com infiltrado escasso e 3 (7,32%) com infiltrado abundante. O Gráfico 4 representa a distribuição consoante as categorias estabelecidas.

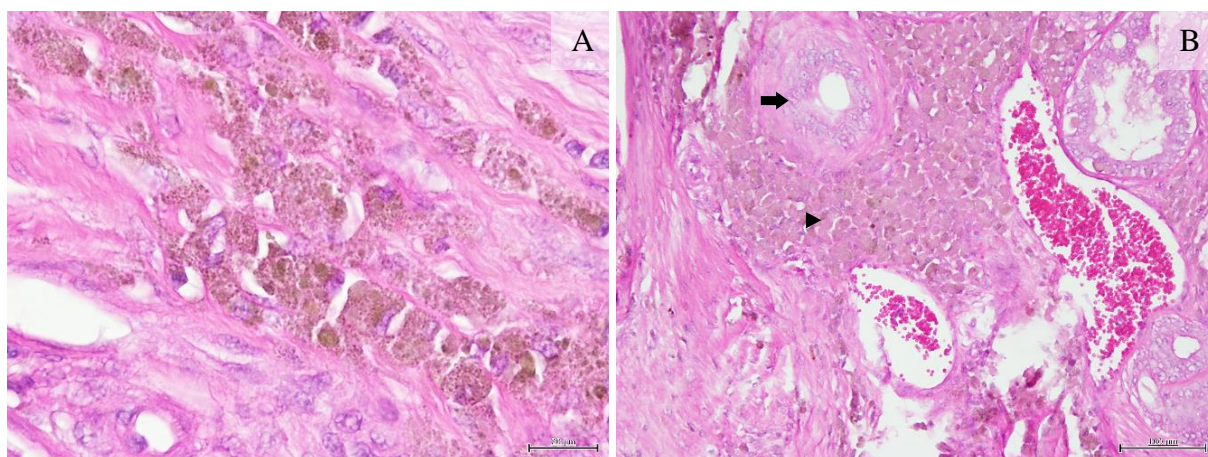
Gráfico 4- Distribuição de acordo com as categorias de quantificação do infiltrado linfoide.



Além dos linfócitos, foram identificadas outras células inflamatórias que infiltravam os processos neoplásicos de origem mamária como os polimorfonucleares neutrófilos (observados anteriormente em conjunto com lesões de necrose celular), macrófagos e mastócitos.

A presença de macrófagos (Figura 8) foi identificada em 4 carcinomas (9,76%) e, em dois casos de carcinoma mamário simples túbulo-papilífero quístico de grau II, foi observada reação inflamatória granulomatosa com granulomas organizados (Figura 8).

Figura 8- Presença de macrófagos e granulomas organizados em carcinomas mamários.



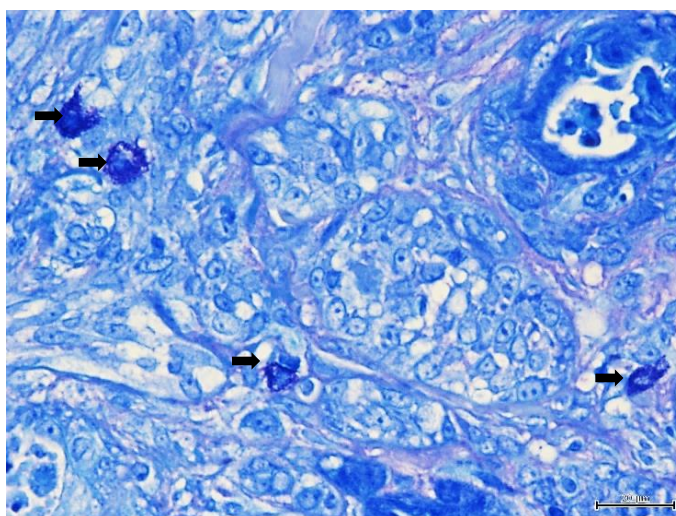
Legenda:

A- Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau II com a presença de macrófagos (H&E, $\times 400$).
B- Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau II com granuloma organizado (ponta de seta) a rodear as células tumorais (seta) (H&E, $\times 100$).

A observação de mastócitos foi verificada num caso de carcinoma mamário complexo sólido de grau III de malignidade. Para observação destas células, além da coloração H&E, foi adicionalmente realizada a coloração de Azul de Toluidina (Figura 9).

A presença de polimorfonucleares eosinófilos foi verificada num único caso correspondente a um mastocitoma de grau II de malignidade considerado como processo neoplásico de origem não mamária. Verificou-se a presença de infiltrado linfo-histo-plasmocitário numa lesão não neoplásica de hiperplasia fibroadenomatosa.

Figura 9- Presença de mastócitos em carcinoma mamário.



Legenda:

Carcinoma mamário complexo sólido de grau II com mastócitos (setas) com distribuição difusa entre as células tumorais epiteliais (Azul de Toluidina, $\times 400$).

3.2.2. Estudo do infiltrado linfoide em carcinomas mamários caninos por imunohistoquímica (n=13)

3.2.2.1. Imunomarcação dos anticorpos anti-CD3 e anti-PAX5

No que concerne aos resultados obtidos após submissão das lâminas selecionadas à técnica de IHQ foi verificada marcação positiva em todos os infiltrados linfoides dos carcinomas mamários incluídos na amostra. A confirmação da marcação positiva é conseguida através da observação da presença de coloração castanha nas células. Os padrões de marcação observados variaram consoante o anticorpo utilizado, assim, o anticorpo anti-CD3 originou um padrão de marcação membranário e/ou citoplasmático e o anticorpo anti-PAX5 exclusivamente nuclear. Foram observados 3 tipos principais de distribuição do infiltrado linfoide: perivascular, marginal e intra-tumoral. Nas Figuras 10 e 11 encontram-se exemplos das marcações obtidas bem como das diferentes distribuições observadas.

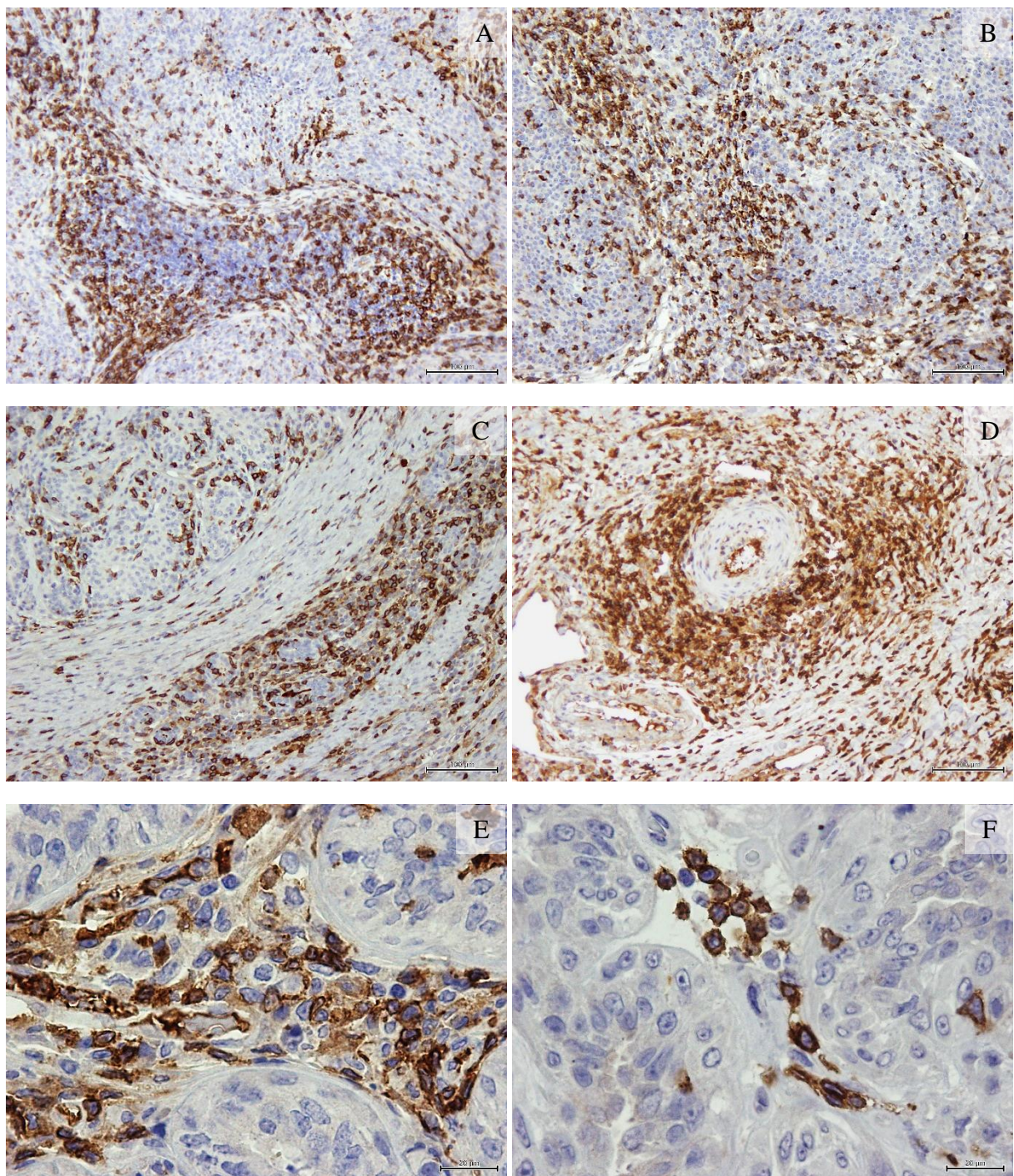
Os valores das percentagens de células com marcação positiva para cada anticorpo encontram-se referidos na Tabela 9. Foi investigada a correlação entre as percentagens de células positivas ao anticorpo anti-CD3 *versus* percentagens de células positivas ao anticorpo anti-PAX5 que não se revelou significativa para o nível de significância de 5% (Anexo 2).

Tabela 9 – Valores da percentagem de células com marcação positiva para cada anticorpo.

Classificação histológica	Grau de malignidade	Células anti-CD3 positivas	Células anti-PAX5 positivas
CMS tubular	III	83,75	54,64
CMS túbulo-papilífero	II	67,13	51,90
CM de células escamosas	III	56,69	69,80
CMS túbulo-papilífero	II	67,23	68,62
CMC tubular*	I	69,94	69,44
CMS tubular*	I	53,15	64,86
CMC tubular	II	61,96	69,95
CMS sólido	III	71,31	75,54
CMC túbulo-papilífero*	II	53,98	72,88
CMS sólido	III	81,13	53,75
CMC tubular*	I	73,15	59,98
CMS túbulo-papilífero	III	77,45	65,93
CMS tubular	II	65,81	35,41

Legenda: CMS – Carcinoma mamário simples; CM – Carcinoma mamário; CMC – Carcinoma mamário complexo; * – Carcinoma misto (presença de diferenciação mesenquimatosa benigna).

Figura 10- Imunomarcação com o anticorpo anti-CD3.



A- Carcinoma simples sólido de grau III com infiltrado linfoide intratumoral e no estroma tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

B- Carcinoma simples sólido de grau III com infiltrado linfoide intratumoral e no estroma tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

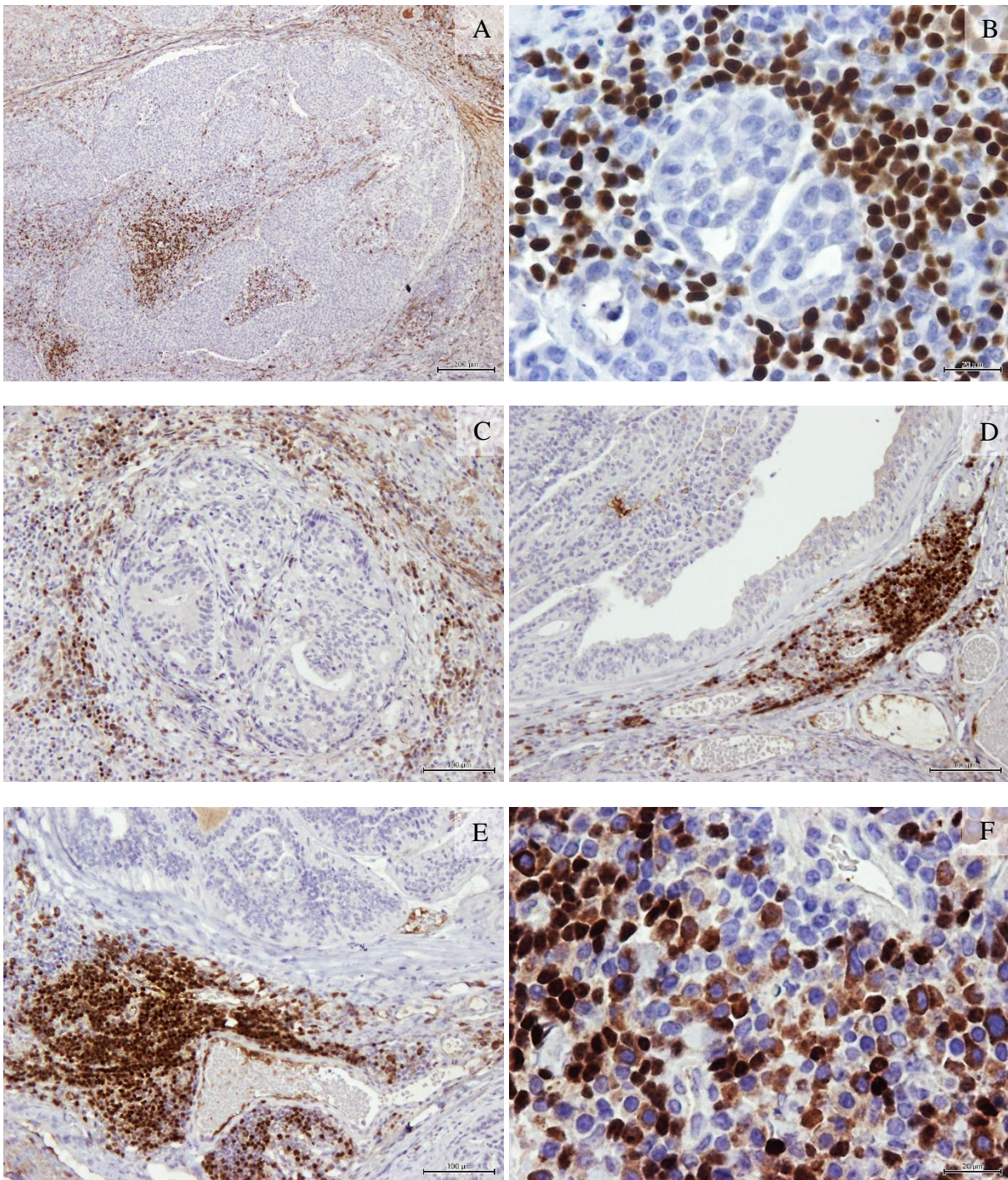
C- Carcinoma simples tubular de grau II com infiltrado linfoide à periferia tumoral e intra-tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

D- Carcinoma simples tubular de grau III com infiltrado linfoide perivascular arterial à periferia tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

E- Carcinoma simples tubular de grau II com infiltrado linfoide intra-tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 400$).

F- Carcinoma complexo túbulo-papilífero quístico de grau II com infiltrado linfoide intra-tumoral (anti-CD3, Hematoxilina de Mayer, $\times 400$).

Figura 11- Imunomarcção com o anticorpo anti-PAX5.



A- Carcinoma simples sólido de grau III com infiltrado linfoide à periferia e intra-tumoral (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 40$).

B- Carcinoma simples sólido de grau III com infiltrado linfoide intra-tumoral (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 400$).

C- Carcinoma simples tubular de grau II com infiltrado linfoide à periferia tumoral (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

D- Carcinoma complexo túbulo-papilífero quístico de grau II com infiltrado linfoide à periferia tumoral, perivascular (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

E- Carcinoma complexo túbulo-papilífero quístico de grau II com infiltrado linfoide à periferia tumoral, perivascular (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 100$).

F- Carcinoma simples túbulo-papilífero quístico de grau III com infiltrado linfoide perivascular (anti-PAX5, Hematoxilina de Mayer, $\times 400$).

3.2.2.2. Densidade linfocitária (células positivas/UA)

Os resultados obtidos para a densidade linfocitária (células positivas/UA) e o rácio calculado entre os valores da densidade para cada anticorpo encontram-se descritos na Tabela 10. Os valores de células positivas/mm² encontram-se em Anexo 3.

No conjunto dos tumores analisados, verificou-se um valor médio de 101,45±28,74 células positivas para o anticorpo anti-CD3/UA e 112,46±41,55 células positivas para o anti-PAX5/UA.

Tabela 10- Resultados obtidos para a quantificação da densidade linfocitária.

Classificação histológica	Grau de malignidade	Densidade linfocitária			
		Células positivas/UA		Rácio células positivas/UA	
		Anti-CD3	Anti-PAX5	$\frac{\text{Anti-CD3}}{\text{Anti-PAX5}}$	$\frac{\text{Anti-PAX5}}{\text{Anti-CD3}}$
CMS tubular	III	124,00	88,17	1,41	0,71
CMS túbulo-papilífero	II	87,67	76,17	1,15	0,87
CM de células escamosas	III	89,33	121,33	0,74	1,36
CMS túbulo-papilífero	II	106,83	113,17	0,94	1,06
CMC tubular	I	104,17	103,50	1,01	0,99
CMS tubular	I	78,83	143,33	0,55	1,82
CMC tubular	II	106,17	140,83	0,75	1,33
CMS sólido	III	142,50	215,17	0,66	1,51
CMC túbulo-papilífero	II	44,83	109,33	0,41	2,44
CMS sólido	III	143,33	120,67	1,19	0,84
CMC tubular	I	91,67	105,17	0,87	1,15
CMS túbulo-papilífero	III	129,33	87,67	1,48	0,68
CMS tubular	II	70,17	37,67	1,86	0,54

Legenda: UA – Unidade de área; CMS – Carcinoma mamário simples; CMC – Carcinoma mamário complexo; CM – Carcinoma mamário.

Foi investigada a correlação entre os valores da densidade linfocitária de células positivas ao anticorpo anti-CD3 *versus* valores da densidade linfocitária de células positivas ao anticorpo anti-PAX5 que não se verificou significativa para o nível de significância de 5% (Anexo 2). Foram realizadas várias correlações entre os valores da percentagem de células positivas e o rácio dos valores da densidade linfocitária (Anexo 2). Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 11 – Resultados obtidos nas correlações realizadas entre os valores da percentagem de células positivas e o rácio dos valores da densidade linfocitária.

		Resultados (n=13)		
% células positivas	Células positivas/UA (valor do rácio)	ρ de Spearman	Valor de p	Comentário
Anti-CD3	$\frac{\text{Anti-CD3}}{\text{Anti-PAX5}}$	0,621	p<0,05	Correlação positiva estatisticamente significativa.
	$\frac{\text{Anti-PAX5}}{\text{Anti-CD3}}$	-0,621	p<0,05	Correlação negativa estatisticamente significativa.
Anti-PAX5	$\frac{\text{Anti-CD3}}{\text{Anti-PAX5}}$	-0,725	p <0,05	Correlação negativa estatisticamente significativa.
	$\frac{\text{Anti-PAX5}}{\text{Anti-CD3}}$	0,725	p <0,05	Correlação positiva estatisticamente significativa.

Legenda: n – Número de casos; UA – Unidade de área; p - Nível de significância estatística.

3.2.2.3. Caracterização das variáveis clínicas e anatomopatológicas da amostra estudada e associação estatística com a densidade linfocitária

Para caracterização da amostra aferiu-se que a média de idades das 13 cadelas incluídas neste estudo foi de $11,15 \pm 2,76$ anos, com um intervalo de idades compreendido entre os 6 e os 15 anos. No que diz respeito à raça, a maioria dos animais (69,23%) foram identificados como raça indeterminada. As raças puras perfizeram 30,77% dos casos com 3 animais de raça Caniche e 1 animal de raça Teckel. Quanto ao estado reprodutivo, apenas 4 cadelas (30,77%) tinham sido sujeitas a OVH no período temporal anterior à excisão cirúrgica do tumor.

Foram identificadas 8 lesões (61,64%) ao nível da cadeia mamária direita. Dessas lesões, 3 tumores (23,08%) estavam localizados ao nível da mama D2 (mama torácica caudal direita). Os tumores estudados apresentaram um valor médio do seu eixo-maior de $2,73 \pm 2,48$ cm com o valor mínimo e máximo de 0,2 e 10 cm, respetivamente.

Todos os tumores incluídos no estudo imunohistoquímico foram classificados como carcinomas. As suas características histopatológicas encontram-se descritas na Tabela 12.

Quanto à classificação histológica, foram identificados 3 carcinomas mamários simples túbulo-papilíferos quísticos, 3 carcinomas mamários complexos tubulares e 3 carcinomas mamários simples tubulares perfazendo cada grupo 23,08% da amostra. Foi observado que 4 em 13 carcinomas eram mistos.

Relativamente ao grau de malignidade, o grau II e III predominam com 5 casos (38,5%) cada. Quanto ao tamanho tumoral, a categoria com maior peso na amostra é a T1 com 8 em 13 casos (61,5%).

Tanto a necrose como a permeação vascular foram identificadas em apenas 1 caso, já a ulceração foi observada em 2 dos casos da amostra.

Foi identificada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,028$, $n=13$) entre a divisão dos carcinomas mistos *versus* carcinomas não mistos e o grau de malignidade. A maioria dos carcinomas mistos (3 em 4) apresentou grau I de malignidade (Anexo 4).

Tabela 12- Características anatomopatológicas dos carcinomas mamários avaliados no estudo imunohistoquímico.

	FA	FR (%)
Classificação histológica		
CM de células escamosas	1	7,69
CMS Túbulo-papilífero quístico	3	23,08
CMC Tubular	3	23,08
CMC Túbulo-papilífero quístico	1	7,69
CMS Tubular	3	23,08
CMS Sólido	2	15,38
Misto		
Sim	4	30,8
Não	9	69,2
Grau de malignidade		
I	3	23,1
II	5	38,5
III	5	38,5
Tamanho tumoral (cm)		
T1 (<3)	8	61,5
T2 (3-5)	4	30,8
T3 (>5)	1	7,7
Necrose		
Presente	1	7,7
Ausente	12	92,3
Ulceração		
Presente	2	15,4
Ausente	11	84,6
Permeação Vascular		
Presente	1	7,7
Ausente	12	92,3

Legenda: FA – Frequência absoluta; FR - Frequência relativa; CM – Carcinoma mamário; CMS – Carcinoma mamário simples; CMC – Carcinoma mamário complexo.

Foi ainda caracterizada a distribuição dos valores obtidos para a densidade linfocitária de acordo com alguns parâmetros histológicos: a divisão entre carcinoma mamário simples *versus* complexo, o subtipo histológico (tubular, túbulo-papilífero, sólido e de células escamosas), a divisão entre carcinoma misto e não misto e o grau de malignidade. A presença de necrose, permeação vascular e ulceração não sofreram inclusão nestes parâmetros devido ao pequeno número de casos nos quais se verificou a sua presença. Foi também considerada a distribuição dos valores da densidade linfocitária segundo a dimensão tumoral.

Relativamente à divisão entre carcinomas simples e carcinomas complexos, 3 em 4 carcinomas complexos apresentaram maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5. Nos 9 carcinomas identificados como simples, 5 apresentaram maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-CD3.

Quanto ao subtipo histológico, é importante mencionar que no caso do carcinoma mamário de células escamosas e nos 2 casos de carcinoma mamário simples sólido o tamanho reduzido da amostra faz com que o resultado estatístico não revele a verdadeira tendência da população alvo, por isso não foi caracterizada a sua distribuição. Nos casos de subtipo tubular e túbulo-papilífero não foi observada prevalência de um tipo de marcação.

No que diz respeito à separação entre carcinomas mistos *versus* não mistos verificou-se que 3 em 4 carcinomas mistos apresentavam uma maior densidade celular positiva ao anticorpo anti-PAX5. Nos carcinomas não mistos, verificou-se que 5 em 9 apresentavam maior densidade celular positiva ao anti-CD3.

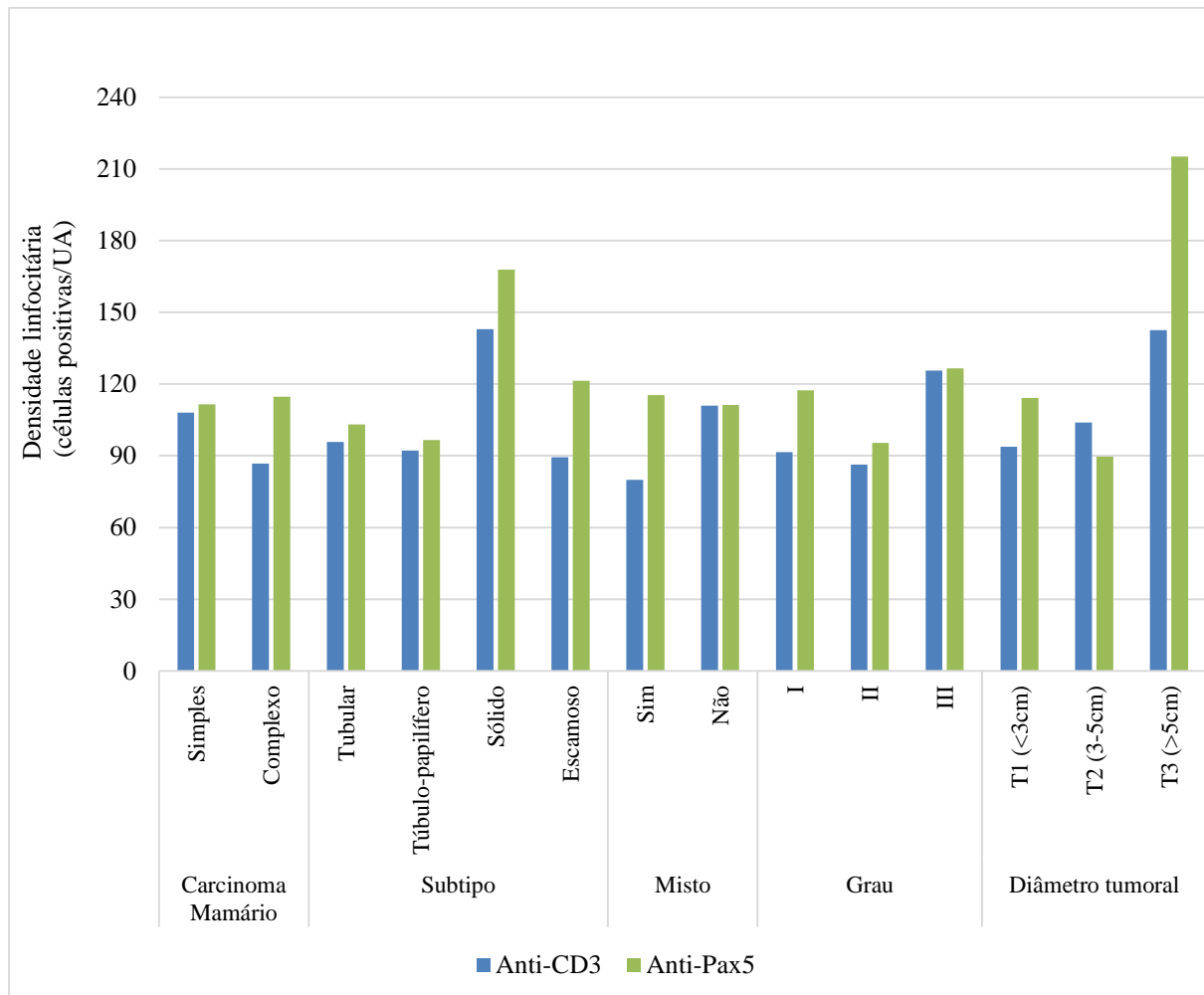
Relativamente ao grau de malignidade, observou-se em 2 dos 3 carcinomas mamários de grau I uma maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5. Nos 5 carcinomas de grau II, observaram-se 3 casos nos quais se verificou maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5. Relativamente ao grau III, 3 dos 5 carcinomas apresentaram uma maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-CD3. É importante referir que, pelo contrário, num caso particular de um carcinoma mamário simples sólido de grau III, se verificou uma elevada densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5 (215,2 células positivas anti-PAX5/UA *versus* 142,5 células positivas anti-CD3/UA).

Relativamente à dimensão tumoral, 4 dos 7 carcinomas incluídos na categoria T1 apresentaram maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5. Na categoria T2 foi observado que 3 dos 5 carcinomas tinham maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-CD3. A categoria T3 não foi considerada por apresentar apenas um caso.

De um modo geral, observou-se um maior número de casos em que os valores obtidos para as células positivas para o anticorpo anti-PAX5/UA foram superiores aos verificados para o

anticorpo anti-CD3. No Gráfico 5 encontra-se a representação do valor médio da densidade linfocitária dos casos pertencentes a cada parâmetro, para cada imunomarcação.

Gráfico 5 – Caracterização da distribuição dos valores médios da densidade linfocitária para cada marcação consoante os parâmetros histológicos considerados e o tamanho do tumor.



Legenda: UA – Unidade de área.

Foram realizadas associações entre os valores obtidos para a densidade linfocitária e as características clínicas e anatomopatológicas da amostra em estudo. Não foi identificada qualquer associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Anexo 5 e 6).

4. Discussão

No que concerne ao valor médio das idades dos animais afetados, tendo em conta as 25 cadelas estudadas inicialmente, o valor foi de $10,12 \pm 2,37$ anos. No grupo de 13 animais selecionados para o estudo imunohistoquímico foi de $11,15 \pm 2,76$ anos. Estas idades estão de acordo com os valores mencionados na literatura (Itoh et al., 2005; Kim et al., 2014; Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2011; Sorenmo et al., 2013).

Euler (2011), Sleenckx et al. (2011) e Sorenmo et al. (2013) referem que as raças de maior risco variam consoante o estudo e a localização geográfica e acrescentam que a raça Caniche é uma das predispostas. Neste trabalho, a maioria dos animais foi identificada como animais de raça indeterminada. Dentro das raças puras predominaram os animais de raça Caniche.

Quanto ao estado reprodutivo, se considerarmos os 25 animais, 9 tinham realizado OVH no período temporal precedente à excisão cirúrgica do tumor mamário. Nos 13 animais cujos tumores mamários foram selecionados para o estudo imunohistoquímico, 4 encontravam-se nessa situação. A importância da OVH na prevenção do desenvolvimento de tumores mamários tem vindo a ser descrita por variados autores (DeTora & McCarthy, 2011; Johnson, 2009; Misdorp, 2002; Schneider et al. 1969; Sorenmo et al., 2013). Hoje sabe-se que a estimulação hormonal aumenta o risco de desenvolvimento de tumores mamários (Euler, 2011). Consequentemente, a situação mais benéfica para a cadela é a realização de OVH, evitando que entre em cio e inicie a produção de hormonas sexuais (Sorenmo et al., 2013). O efeito preventivo da realização desta cirurgia após o terceiro estro não está documentado (Sorenmo et al., 2013).

Misdorp (2002) afirma que a incidência de tumores mamários aumenta no sentido antero-posterior do animal. MacPhail (2013), Sleenckx et al. (2011), Sorenmo et al. (2011) e Sorenmo et al. (2013) mencionam que os tumores são mais frequentes onde a cadeia mamária apresenta mais tecido, isto é, nas glândulas mais caudais. Nas 41 neoplasias de origem mamária consideradas, foi observado que as glândulas mamárias abdominais (craniais e caudais) foram as mais atingidas. Considerando apenas os 35 carcinomas, a glândula abdominal caudal foi a mais afetada. Nos 13 carcinomas selecionados para o estudo imunohistoquímico, verificou-se prevalência de lesões ao nível da mama torácica caudal.

Sorenmo et al. (2009) referem que 66,7% das cadelas incluídas no seu estudo apresentavam lesões múltiplas. No presente trabalho, o número médio de tumores mamários por animal foi de $1,86 \pm 1,96$ e 36% dos animais apresentavam lesões múltiplas. O número máximo de tumores presentes no mesmo animal foi de 10 e a moda foi de uma lesão tumoral por animal. Murphy

(2008), Peleteiro (1999), Sorenmo et al. (2011) entre outros referem a característica multiplicidade lesional deste tipo de tumores nesta espécie.

Tendo em conta os 41 tumores mamários iniciais o valor médio do eixo-maior foi de $2,74 \pm 2,57$ cm. À semelhança do referido no estudo de Sorenmo et al. (2009), verificaram-se diferenças entre o diâmetro de lesões malignas e benignas ($3,02 \pm 2,66$ cm e $1,1 \pm 0,98$ cm, respetivamente). Nos 13 carcinomas selecionados para o estudo imunohistoquímico, o valor médio do eixo-maior foi de $2,73 \pm 2,48$ cm (valor mínimo de 0,2 cm e máximo de 10 cm). Estes valores vão de encontro a resultados previamente publicados, como é o caso de Peña et al. (2013), que referem um diâmetro tumoral médio de 2,2 cm com valores a variarem entre 0,5 e 14 cm.

De acordo com o que está descrito nos trabalhos de Ežerskytė et al. (2011), Rasotto et al. (2012), Sorenmo et al. (2009) e Szczubiał e Łopuszynski (2011), nos quais foi verificado predomínio de carcinomas mamários simples, no presente estudo observou-se uma maioria de carcinomas mamários simples nas 41 neoplasias de origem mamária consideradas e, dentro destes, 26,83% eram tubulares. Nos 13 carcinomas do estudo imunohistoquímico, não se verificou prevalência de um subtipo histológico específico. Verificou-se uma associação estatisticamente significativa ($p=0,006$, $n=41$) entre os carcinomas e adenomas simples *versus* complexos com a dimensão tumoral. Se considerarmos apenas os 35 carcinomas iniciais, a mesma associação apresenta um comportamento semelhante ($p=0,046$, $n=35$) com os carcinomas simples a apresentarem maior dimensão.

Os carcinomas simples estão associados a um pior prognóstico que as complexas (Euler, 2011; Misdorp, 2002; Peña et al., 2014). Szczubiał e Łopuszynski (2011) verificaram a presença de células neoplásicas em 38,46% dos linfonodos adjacentes a carcinomas complexos e em 56,67% dos adjacentes a carcinomas simples, indicando prognóstico desfavorável dos últimos. No presente trabalho, os carcinomas simples apresentaram maior dimensão que os carcinomas complexos. Sabe-se que quanto maior o tamanho do tumor pior é o prognóstico e, como os carcinomas simples apresentaram maior dimensão, podem ser indiretamente associadas a uma maior malignidade ou pior prognóstico como está descrito no trabalho de Sorenmo et al. (2009). Quanto ao grau de malignidade dos 35 carcinomas iniciais, verificou-se uma maioria de lesões com grau II (41,71%). Nos 13 casos selecionados posteriormente verificaram-se 5 casos de grau II e de grau III. Foi identificada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,007$; $n=35$) entre o subtipo histológico e o grau de malignidade tumoral. Foi verificado que todos os casos de carcinoma de células escamosas e carcinoma sólido apresentavam grau III, os carcinomas tubulares apresentavam-se maioritariamente de grau I e os túbulo-papilíferos de grau II. Esta situação surge de acordo com o estudo de Peña et al. (2013) onde está descrita uma associação

estatisticamente significativa entre o tipo histológico e o grau de malignidade. Estes autores observaram que cerca de 66,7% dos carcinomas sólidos apresentavam grau III. Noutro estudo, Im et al. (2014) verificaram que todos carcinomas de células escamosas apresentavam grau III. Rasotto et al. (2012) classificaram os carcinomas simples sólidos com grau II ou III e os carcinomas simples tubulares e túbulo-papilíferos com grau I ou II.

No presente trabalho, foi ainda encontrada outra associação estatisticamente significativa ($p=0,025$, $n=35$) entre o grau de malignidade dos carcinomas e o tamanho tumoral. As lesões maiores eram de grau II ou III enquanto que os carcinomas mais pequenos apresentavam-se distribuídos pelas três categorias de malignidade. A dimensão está relacionada com o número de divisões celulares e uma probabilidade mais elevada de maior malignidade tumoral por acumulação de mutações (Santos et al., 2012). Itoh et al. (2005) referem a associação estatisticamente significativa de tumores de pequenas dimensões com uma maior sobrevida das cadelas após mastectomia.

Mesmo considerando as 41 neoplasias de origem mamária a necrose, calcificação, ulceração, permeação vascular e metastização no linfonodo mamário não foram lesões muito frequentes. As lesões de necrose são características de tumores com comportamento maligno e têm sido associadas a um pior prognóstico. Neste trabalho, a necrose foi identificada em apenas 4 carcinomas (de grau III e II). No estudo de Kim et al. (2014), os carcinomas com o fenótipo associado ao pior prognóstico (sem expressão de recetores de progesterona nem de estrogénio) apresentavam maior número de casos de presença de necrose central (85,2%). Im et al. (2014) referem que a presença de necrose se registou em 11,1% dos tumores benignos contrastando com 33,8% dos tumores malignos.

A presença de calcificação distrófica foi verificada num caso de carcinoma simples de grau III. Este carcinoma apresentava, concomitantemente, extensas lesões de necrose. Myers e McGavin (2007) referem que a presença deste tipo de calcificação costuma surgir secundariamente ao processo de necrose celular. Quanto à presença de ulceração, foi observada em apenas 2 carcinomas simples (de grau II e III). Murphy (2008) afirma que os tumores mamários que apresentam ulceração estão associados a um pior prognóstico. Um crescimento invasivo, que promova lesão do tecido cutâneo suprajacente, tem sido associado a maior malignidade (Misdorp, 2002; Sleekx et al., 2011).

Neste estudo, a presença de permeação vascular e metastização ao nível do linfonodo mamário foram diagnosticadas num carcinoma de grau III. Sleekx et al. (2011) referem que a metastização ao nível dos linfonodos regionais tem relevância no prognóstico clínico do animal. De Boer et al. (2010), num estudo em humanos, associam a presença de metástases nos linfonodos axilares com a diminuição do tempo de sobrevida. À semelhança do que se verifica

em humanos, têm sido realizados vários estudos em tumores mamários caninos, nos quais a presença de metástases ao nível dos linfonodos regionais está relacionada com um prognóstico desfavorável e redução do tempo de sobrevida (Santos et al., 2014; Szczubiał e Łopuszynski, 2011; Peña et al., 2013). No presente estudo, a associação destas lesões com parâmetros indicativos de um prognóstico mais reservado não foi verificada. Tal situação poderá ter resultado do reduzido número de casos analisados que de futuro convirá aumentar de forma a demonstrar a verdadeira tendência populacional.

Os efeitos do infiltrado inflamatório nos tumores da mama são variados e complexos. De facto, a afirmação de que o sistema imunológico promove ou previne o desenvolvimento tumoral não pode ser realizada sem a caracterização específica dos vários tipos de células e as respetivas funções (Bui & Schreiber, 2007).

Neste trabalho, o estudo inicial da resposta inflamatória passou por observação microscópica de lâminas coradas com H&E. Nas 41 amostras tumorais mamárias foram identificadas as seguintes populações celulares: linfócitos (com maior representação), macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos e mastócitos. Foram também observados sinais de inflamação granulomatosa em 2 casos.

À semelhança do que foi observado no presente estudo, Im et al. (2014) referem que a maioria das células inflamatórias que infiltravam os tumores mamários eram linfócitos, não obstante, mastócitos, plasmócitos e macrófagos foram igualmente identificados. De igual modo, Estrela-Lima et al. (2010) verificaram que os linfócitos foram o tipo de célula inflamatória predominante em carcinomas mamários. Kim et al. (2010) observaram que, nos casos de tecido mamário sem alterações neoplásicas ou tumores benignos, raramente foram identificados linfócitos.

Apesar da dinâmica do papel dos macrófagos não ser completamente conhecida, na maioria dos casos, a presença de macrófagos no tumor está relacionada com a progressão tumoral e metastização (Qian & Pollard, 2010). Eubank et al. (2008) demonstraram, em modelos de tumor mamário de rato, que o tratamento local com fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) abrandou o crescimento tumoral. Com o tratamento os macrófagos presentes no tumor sofreram uma “re-educação” no sentido anti-tumoral, produzindo uma molécula que inativa o VEGF e bloqueia a angiogénese. Pelo contrário, no estudo de Al Murri et al. (2008), em tumores mamários de mulher, a presença de macrófagos foi associada a um elevado grau de malignidade, expressão negativa de recetores hormonais e maior densidade de microvasos. Noutro estudo em tumores mamários humanos, o fator 1 estimulante de colónias (CSF-1), que regula os macrófagos presentes nos tecidos, foi correlacionado com um elevado

grau de malignidade tumoral, menor expressão de recetores hormonais e maior número de mutações ao nível de p53 (Beck et al., 2009). Todos estes fatores são preditivos de pior prognóstico.

Relativamente ao papel dos neutrófilos, Queen, Ryan, Holzer, Keller-Peck e Jorcyk (2005) aferiram que o GM-CSF, proveniente das células neoplásicas de tumor da mama, induziu a produção de oncostatina M (OSM) pelos neutrófilos. Esta citocina promoveu a libertação de VEGF por parte das células neoplásicas, amplificando o comportamento invasivo do tumor.

Os mastócitos encontram-se entre as primeiras células inflamatórias recrutadas para os locais com tumores sólidos. O seu número é elevado em lesões pré-cancerígenas e aumenta com a progressão tumoral (Oldford & Marshall, 2015). Rajput et al. (2008), num estudo em medicina humana, observaram que 28,2% dos casos de tumores mamários apresentavam mastócitos e, que a sua presença, constitui um indicador de melhor prognóstico. O tempo médio de sobrevivência das pacientes cujo estroma tumoral estava infiltrado por estas células foi superior ao daquelas que não estava. Quando os mastócitos sofrem ativação libertam moléculas que poderão inibir o crescimento tumoral, tais como a heparina. No seu estudo, Samoszuk et al. (2005) refere que esta substância apresenta propriedades inibidoras do crescimento de células tumorais da mama.

Neste trabalho, a presença de infiltrado linfoide registou-se em 21 dos 41 processos neoplásicos de origem mamária. Simonson e Allison (2010) referem que as diferentes localizações (no tumor *per se* ou no interface tumor-estroma tumoral) podem explicar resultados díspares na quantificação dos linfócitos. No presente trabalho, a distribuição do infiltrado linfoide foi caracterizada como perivascular, marginal e intra-tumoral. Esta distribuição está de acordo com Peleteiro (1994), que menciona que a infiltração inflamatória por plasmócitos e linfócitos pode ser difusa ou perivenosa. Marsigliante et al. (1999) observaram que o padrão predominante de distribuição dos infiltrados linfocitários foi ao nível do estroma situado entre as células tumorais. Matkowski et al. (2009) verificaram que, na maioria dos tumores do seu estudo, o infiltrado linfocitário se localizava ao nível das margens tumorais. Kim et al. (2010) referem que a infiltração por células mononucleadas (predominantemente linfócitos) foi observada ao nível do estroma tumoral que envolvia as células neoplásicas e os vasos. Carvalho, Pires, Prada e Queiroga (2011) observaram zonas tumorais com acumulação perivenosa de linfócitos T. Não obstante, a infiltração linfoide difusa foi o padrão predominante.

O tipo de expressão proteica que as células cancerígenas apresentam, suscita uma resposta inflamatória linfocitária específica. Admitindo que a intensidade do infiltrado linfocitário associado aos tumores reflete a intensidade da resposta inflamatória específica, a primeira poderá ser utilizada como marcador da resposta imunológica ao tumor (Simonson & Allison,

2010). Contudo, deverá ter-se em conta que, nas neoplasias mamárias de cadela, são comuns as lesões de necrose e a libertação de produtos de secreção, podendo ser desencadeadas reações inflamatórias inespecíficas que é necessário distinguir da reação desencadeada pelo próprio tumor (Peleteiro, 1994). Na tentativa de avaliar o valor prognóstico da inflamação em cancro da mama da mulher, Rakha et al. (2009) associaram a reação inflamatória linfo-histiocítica exacerbada a um elevado grau de malignidade. No estudo de Kim, Chon, Im, Kim e Sur (2013) foi verificado um maior nível de infiltração linfoide nos tumores com invasão dos vasos linfáticos e com menor grau de diferenciação histológica. Estrela-Lima et al. (2010) verificaram que, nas cadelas cujos tumores apresentavam infiltrado linfocitário discreto ou moderado, as taxas de sobrevivência eram significativamente mais elevadas em comparação com aquelas cujo infiltrado linfocitário associado aos tumores era intenso. Os números mais elevados de linfócitos, em conjunto com a presença de metástases ao nível do linfonodo, foram observados nos grupos de animais com as menores taxas de sobrevivência. No presente trabalho, como já referido, 21 dos 41 tumores mamários apresentavam infiltrado inflamatório. Desses, 11 (26,83%) apresentavam infiltração moderada e 3 (16,66%) abundante. Ao contrário dos estudos supramencionados, neste estudo, não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre a intensidade da infiltração e fatores prognósticos.

Relativamente ao estudo imunohistoquímico, foi observada marcação positiva em todos os infiltrados linfoides dos carcinomas mamários incluídos na amostra. Os padrões marcação obtidos foram os esperados, indo de encontro ao referido pelos fabricantes nas respetivas fichas de especificação dos anticorpos primários. Ao longo deste trabalho as células identificadas através de imunohistoquímica foram classificadas como com marcação positiva ao anticorpo em questão (anti-CD3 ou anti-PAX5). A adoção desta nomenclatura teve em conta as características dos anticorpos utilizados.

Foi realizada a associação dos valores da densidade linfocitária com variáveis clínicas e anatomopatológicas, contudo, não foi verificado nenhum resultado estatisticamente significativo. Caso a análise se tivesse comprovado significativa, teria sido possível associar os resultados obtidos a fatores admitidos como prognósticos e inferir certas conclusões. É importante referir que, devido ao tamanho reduzido da amostra, que conduziu a um reduzido número de casos por cada categoria considerada, o resultado estatístico pode não revelar a verdadeira tendência da população. Seria necessário um estudo com maior casuística para avaliar eventuais associações.

Não obstante, a densidade linfocitária foi caracterizada consoante 5 parâmetros: carcinomas simples *versus* complexos, subtipo histológico, “carcinoma misto” *versus* “não misto”, grau de malignidade histológica e a dimensão tumoral.

Na maioria dos casos de carcinomas simples foi verificada maior densidade celular positiva ao anticorpo anti-CD3, quanto aos carcinomas complexos as células positivas ao anticorpo anti-PAX5 predominaram na maioria dos casos. Quanto aos subtipos histológicos considerados, não se verificou qualquer predominância de um tipo de marcação. Segundo alguns autores, o infiltrado linfoide está associado ao tipo histológico. Kim et al. (2013), num estudo realizado em tumores mamários caninos, verificaram que um nível elevado de infiltração linfoide é mais frequente em carcinomas de células escamosas, enquanto que um nível baixo de infiltração linfoide é mais frequente em carcinomas simples. Carvalho et al. (2011) verificaram que os carcinomas sólidos estão associados a uma maior presença de linfócitos T intra-tumorais.

A maioria dos carcinomas mistos apresentavam maior densidade células positivas ao anticorpo anti-PAX5.

No que concerne ao grau de malignidade, a maioria dos carcinomas de grau I e II apresentaram maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-PAX5 e a maioria dos carcinomas de grau III maior densidade de células positivas ao anticorpo anti-CD3. A associação entre o grau de malignidade e a resposta inflamatória linfocitária foi verificada por Mahmoud et al. (2011). Estes autores associaram positivamente o número total linfócitos T citotóxicos CD8⁺ que infiltram o tumor com um maior grau de malignidade tumoral.

Relativamente ao tamanho tumoral, os carcinomas incluídos na categoria T1 apresentaram, na maioria dos casos, uma infiltração principalmente constituída por células positivas ao anticorpo anti-PAX5. Quanto aos carcinomas da categoria T2, foram observadas maiores densidades de células positivas ao anticorpo anti-CD3 na maioria dos tumores.

Em alguns estudos, os linfócitos B e T infiltrados em tumores mamários têm sido associados a parâmetros de caráter prognóstico que diferem dos adotados na presente dissertação. Eiró et al. (2012) avaliaram os infiltrados linfocitários presentes em carcinomas ductais invasivos humanos e demonstraram associação entre o número de linfócitos CD3⁺ com o *status* dos RE e RP. Os carcinomas negativos a ambos os recetores apresentaram um número mais elevado de linfócitos CD3⁺. Além disso, observaram ainda que os carcinomas de *status* HER-2 positivo apresentaram maior número linfócitos B CD20⁺. No estudo de Carvalho et al. (2011) um maior número de linfócitos T intra-tumorais foi associado à presença de permeação vascular. Kim et al. (2013) verificaram associação entre o maior nível de infiltração por linfócitos CD3⁺ com menor grau de diferenciação histológica e invasão dos vasos linfáticos. Observaram, de igual

forma, associações entre o maior nível de infiltração por linfócitos B CD79 α ⁺ com menor grau de diferenciação histológica e invasão dos vasos linfáticos.

Quando analisados os valores médios da densidade linfocitária distribuídos pelos 5 parâmetros selecionados, foram observados mais casos com maior número de células positivas ao anticorpo anti-PAX5/UA. Da mesma forma, quando calculado o valor médio da densidade linfocitária no conjunto dos tumores da amostra, verificou-se uma predominância de células positivas ao anticorpo anti-PAX5/UA. O valor médio de 5623,77 \pm 2077,26 células positivas para o anticorpo anti-PAX5/mm² (Anexo 3) situa-se na mesma ordem de grandeza dos valores obtidos para as células CD20⁺ no estudo de Loughlin et al. (2007), em tumores mamários de mulher. O valor médio de células positivas para o anticorpo anti-CD3/UA (101,45 \pm 28,74) está de acordo com o estudo de Marsigliante et al. (1999) que registou um valor médio de 139 linfócitos CD3⁺ por unidade de área. Contudo, estes autores verificaram que os infiltrados linfocitários eram maioritariamente constituídos por linfócitos CD3⁺ em 64,4% dos tumores da amostra, situação que contrasta com os resultados do presente trabalho. Kim et al. (2010) registaram, igualmente, uma presença de linfócitos T superior à de linfócitos B e verificaram que os linfócitos T CD3⁺ ocupam 1,02% da área considerada, enquanto que as células B CD79 α ⁺ ocupam apenas 0,37%. Estrela-Lima et al. (2010) referem que a percentagem de células T foi mais elevada nos carcinomas em tumores mistos, sem metástases, enquanto a percentagem de linfócitos B foi maior nos carcinomas com metástases. Os valores obtidos neste presente trabalho não estão de acordo com os referidos autores, verificando-se um maior número de células positivas ao anticorpo anti-PAX5, isto é, de linfócitos B.

A infiltração linfocitária associada aos tumores foi um dos primeiros marcadores da resposta inflamatória a ser estudado quanto ao seu valor prognóstico (Simonson & Allison, 2010). Os linfócitos T presentes no tumor poderão estar envolvidos em distintos, e mesmo contraditórios, mecanismos consoante o tipo de subpopulação. Devido à complexidade de funções e subpopulações linfocitárias, é razoável assumir, que a simples quantificação do infiltrado linfocitário sem realização da caracterização dos vários subtipos celulares pode não descrever corretamente a ação do infiltrado. Além disso, com a interação entre várias populações celulares, citocinas e mesmo certos fatores tumorais, torna complexa e difícil a obtenção de informação prognóstica significativa através do exame de infiltrados linfocitários.

Estudos realizados em vários tipos tumores têm associado positivamente a presença linfócitos T CD8⁺ com prognósticos favoráveis e maior tempo de sobrevida. Estrela-Lima et al. (2010) referem que a percentagem relativa de linfócitos T CD4⁺ infiltrados no tumor foi mais elevada nos carcinomas mamários com metástases e a de células T CD8⁺ nos casos sem metástase.

Independentemente do tipo de tumor, verificaram também, que os animais com elevada proporção de células T CD4⁺/CD8⁺ apresentaram menor taxa de sobrevida. De igual forma, Mahmoud et al. (2011) afirmam que o número total de células T CD8⁺ se encontra associado com maior sobrevida das pacientes. A mesma situação foi demonstrada por Kawai et al. (2008) em carcinomas pulmonares de não-pequenas células, por Leffers et al. (2008) em carcinoma do ovário e por Gao et al. (2007) em carcinomas hepatocelulares. Este autor observou também que um baixo número de linfócitos T reguladores é indicador de um melhor prognóstico. Pelo contrário, quando presentes em elevadas densidades, os linfócitos Treg foram associados com casos de permeação vascular.

Outros autores referem a associação dos linfócitos CD8⁺ com um prognóstico desfavorável. Sheu et al. (2008) observaram que o número de linfócitos T CD8⁺ infiltrados no tumor mostrou um aumento significativo com a progressão do estadio tumoral. Este aumento levou à diminuição do rácio de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ que foi correlacionada com permeação vascular e conseqüentemente metastização ao nível dos linfonodos. Al Murri et al. (2008) associaram um grau de malignidade elevado à presença de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), a expressão negativa de recetores hormonais a uma maior infiltração de linfócitos T CD8⁺ e uma maior densidade de microvasos tumorais à presença de linfócitos T CD4⁺.

Num estudo em carcinomas mamários caninos, Kim et al. (2012), associaram um maior número de linfócitos Treg FOXP3⁺ a fatores prognósticos desfavoráveis como menor grau de diferenciação histológica, permeação vascular e presença de necrose. Pelo contrário, West et al. (2013), num estudo em tumores mamários humanos negativos para RE, associaram níveis elevados de linfócitos FOXP3⁺ a um maior tempo de sobrevivência sem recorrência tumoral.

Através da aplicação do coeficiente de correlação de Spearman, para o nível de significância de 5%, só foi encontrada evidência de forte associação entre a percentagem de células positivas e os rácios dos valores da densidade linfocitária (Tabela 11). Quando comparadas com base no mesmo imunomarcador, as associações revelaram-se positivas, indicando que para o mesmo imunomarcador, o aumento dos valores da percentagem de células positivas está associado ao aumento dos valores da densidade linfocitária. Quando comparadas usando imunomarcadores diferentes para cada uma destas variáveis, as associações revelaram-se negativas, indicando que para diferentes imunomarcadores, o aumento numa das variáveis está associado à diminuição dos valores na outra.

As restantes correlações realizadas, não se revelaram significativas para o nível de significância de 5%. De acordo com trabalhos anteriormente realizados têm sido verificadas associações entre as diferentes populações de linfócitos infiltrados no tumor. Wolf et al. (2015), num estudo

em tumores de células escamosas da cavidade oral em humanos, verificaram correlações positivas entre os valores médios de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e FOXP3⁺. No estudo de Miyashita et al. (2014) em tumores mamários, foram verificadas correlações positivas entre os linfócitos FOXP3⁺ e CD8⁺ nos três compartimentos tumorais avaliados (intra-tumoral, estroma adjacente e estroma distante). De uma forma semelhante, West et al. (2013) observaram correlações positivas fortes entre células FOXP3⁺ e CD8⁺ infiltradas em tumores mamários. Estas correlações foram observadas independentemente dos linfócitos CD8⁺ se encontrarem no epitélio tumoral ou no estroma tumoral. Matkowski et al. (2009) verificaram uma forte correlação positiva entre a expressão de CD4 e CD8. Marsigliante et al. (1999) observaram a mesma situação entre linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺, CD3⁺ e CD8⁺ e CD4⁺ e CD8⁺. À semelhança da presente dissertação Marsigliante et al. (1999) não observou qualquer correlação entre as subpopulações de linfócitos T e os linfócitos B CD20⁺.

No estudo de Eiró et al. (2012) em carcinomas mamários humanos, foi verificada associação positiva entre o número de células CD3⁺ e o número de células CD20⁺. Milne et al. (2009), num estudo em tumores do ovário, observaram várias associações positivas entre CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e entre CD20⁺ e CD3⁺ ou CD8⁺. As associações verificadas entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD20⁺) mostram resultados semelhantes ao que seriam expectáveis de obter na presente dissertação. Apesar de ter sido utilizado um imunomarcador diferente para marcação dos linfócitos B, quando foi realizada a correlação entre as densidades linfocitárias para cada imunomarcador seria de esperar que a associação se tivesse verificado estatisticamente significativa. Muito provavelmente, devido ao pequeno número de casuística, não se verificaram associações para o nível de significância de 5%.

A investigação da existência de correlações entre as células dos infiltrados linfoides tem importante valor na caracterização da resposta inflamatória associada aos tumores. Além do papel promotor ou inibidor da tumorigénese já estudado, as células do sistema imunológico ainda comunicam e interagem largamente entre si. Cruzando o conhecimento das implicações de cada subpopulação linfocitária no desenvolvimento tumoral com a evidência das relações que estas células apresentam entre si, poderão ser realizadas associações indiretas a certos fatores prognósticos através do estudo do comportamento de umas células em relação às outras. Desta forma, será possível a investigação e formulação de novas hipóteses através de conhecimentos já adquiridos a partir de algumas subpopulações linfocitárias mais estudadas. Além disso, é interessante avaliar o “impacto” biológico existente entre diferentes tipos celulares como é o caso dos linfócitos Treg. Este tipo de linfócitos encontra-se aumentado em certos carcinomas humanos e a sua presença inibe a proliferação de linfócitos T citotóxicos específicos contra as células tumorais (Maia & Cardoso, 2012). A investigação de associação é

igualmente interessante na avaliação de situações presuntivas, como referem Wolf et al. (2015), que obtiveram uma associação positiva entre linfócitos CD4⁺ e FOXP3⁺ porque os últimos constituem uma subpopulação dos primeiros.

Mais investigação será necessária para avaliar corretamente as múltiplas associações entre as várias subpopulações linfocitárias presentes nos infiltrados inflamatórios associados aos tumores. Para tal, será necessária uma uniformização dos métodos de identificação e contagem das células, bem como de avaliação dos resultados de forma a permitir a comparação entre o crescente número de estudos.

V. Conclusão e perspectivas futuras

A imunologia tumoral constitui uma vasta área de estudo das interações entre o sistema imunológico do indivíduo e as células tumorais. Sabe-se, que a imunidade apresenta um papel no desenvolvimento tumoral, contudo, o modo como a resposta inflamatória atua permanece em debate. Os infiltrados inflamatórios linfocitários associados aos tumores têm sido alvo de grande importância. A sua quantificação tem vindo a ser estudada como marcador que antevê o curso clínico da doença tanto por associação com características de valor prognóstico já definido, como em estudos de análise de sobrevivência.

Nesta dissertação, o primeiro tipo de associação foi investigado mas não se verificou para o nível de significância de 5%. Não obstante, teria sido interessante o estabelecimento de associações com características clínicas e anatomopatológicas consideradas prognósticas. Os resultados estatísticos foram condicionados pelo reduzido número de casos, seria necessário um estudo de maior casuística para obter resultados significativos.

A presente dissertação permitiu concluir que diferentes populações celulares inflamatórias infiltram os tumores mamários de cadela tais como linfócitos, macrófagos, mastócitos e neutrófilos. De entre os vários elementos celulares observados, os infiltrados linfoides destacaram-se, tendo sido observados em aproximadamente metade da amostra do estudo, exibindo três distribuições preferenciais no tumor: perivascular, marginal e na parte central do tumor.

A aplicação da técnica de imunohistoquímica deteve um papel fundamental por facilitar a observação dos linfócitos localizados entre as células tumorais mas, principalmente, por permitir a caracterização de duas populações linfocitárias presentes nos infiltrados: linfócitos T e linfócitos B. Só assim foi possível aferir a predominância deste último tipo de células linfoides.

Foi investigada a eventual correlação existente entre as duas populações linfocitárias, não tendo sido obtido um valor significativo. Este tipo de análise não é tão frequente mas já foi realizada em alguns estudos semelhantes. O seu interesse reside no facto de que além do papel promotor ou inibidor da tumorigénese, as células do sistema imunológico ainda comunicam e interagem largamente entre si. Desta forma, o estudo das eventuais correlações entre as diferentes subpopulações linfocitárias, é muito importante na caracterização da resposta inflamatória associada aos tumores.

Apesar do crescente número de estudos na área, pela variabilidade de metodologias de identificação e contagem aplicadas, surgem resultados variados dando origem a algum

desacordo sobre o valor prognóstico de cada subpopulação linfocitária. Será necessária uma uniformização dos procedimentos para que a informação se torne consensual e com aplicabilidade prática, constituindo novas formas seguras e expeditas de emitir prognóstico. Aliando a evolução tecnológica à compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no reconhecimento das células tumorais pelo sistema imunológico surgem novas modalidades terapêuticas, tais como a imunoterapia anti-tumoral, que poderão delinear novos caminhos na luta contra o cancro.

VI. Bibliografia

Ahn, E.R. & Vogel, C.L. (2012). Dual HER2-targeted approaches in HER2- positive breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, 131, 371-83.

Alkan, F., Ustüner, O., Bakirel, T., Cınar, S., Erten, G. & Deniz, G. (2012). The effects of piroxicam end deracoxib on canine mammary tumour cell line. *The Scientific World Journal*, 2012; 2012: 976740.

Al Murri, A.M., Hilmy, M., Bell, J., Wilson, C., McNicol, A.-M., Lannigan, A., Doughty, J.C. & McMillan, D.C. (2008). The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *British Journal of Cancer*, 99, 1013 – 1019.

Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., Nedospasov, S. & Karin, M. (2010). B-cell derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*, 464, 302–305.

Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G., Naldini, L., de Visser, K.E., De Palma, M. & Coussens, L.M. (2011). FcR γ activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell*, 17, 121-134.

Armbrust, L.J., Biller, D.S., Bamford, A., Chun, R., Garrett, L.D. & Sanderson, M.W. (2012). Comparison of three-view thoracic radiography and computed tomography for detection of pulmonar nodules in dogs with neoplasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240 (9), 1088-1094.

Balkwill, F., Montfort, A. & Capasso, M. (2013). B regulatory cells in cancer. *Trends in Immunology*, 34(4), 169-173.

Bearss, J.J., Schulman, F.Y. & Carter, D. (2012). Histologic, immunohistochemical, and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *Veterinary Pathology*, 49(4), 602-607.

Beck, A.H., Espinosa, I., Edris, B., Li, R., Montgomery, K., Zhu, S., Varma, S., Marinelli, R.J., Rijn, M. & West, R.B. (2009). The macrophage colony stimulating factor-1 response signature in breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 15(3), 778-787.

Bergman, P.J. (2009). Cancer immunotherapy. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24 (3), 130-136.

Bird, R.C., Deinnocentes, P., Bird, A.C.E., van Ginkel, F.W., Lindquist, J. & Smith, B.F. (2011). An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion vaccine. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 60(1), 87-97.

Borge, K.S., Børresen-Dale, A.L. & Lingaas, F. (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9 (4), 241–250.

- Bonecchi, R., Locati, M. & Mantovani, A. (2011). Chemokines and cancer: a fatal attraction. *Cancer Cell*, 19(4), 434-435.
- Bui, J.D. & Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?. *Current Opinion in Immunology*, 19, 203-208.
- Carvalho, M.I., Pires, I., Prada, J. & Queiroga, F.L. (2011). T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: clinic and prognostic implications. *In vivo*, 25, 963-970.
- Cassali, G.D., Gobbi, H., Malm, C. & Schmitt, F.C. (2007). Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, 18, 191-196.
- Chang, S.-C., Chang, C.-C., Chang, T.-J. & Wong, M.-L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227, 1625-1629.
- Chang, C.-C., Tsai, M.-H., Liao, J.-W., Chan, J.P.-W., Wong, M.-L. & Chang, S.-C. (2009). Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235 (4), 391-396.
- Chow, M.T., Möller, A. & Smyth, M.J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 22, 23-32.
- Cleary, M.P., Grossmann, M.E. & Ray, A. (2010). Effect of obesity on breast cancer development. *Veterinary Pathology*, 47 (2), 202-213.
- Clemente, M., Pérez-Alenza, M.D. & Peña, L. (2010). Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143, 157-163.
- Dai, Y. & Wang, W.H. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 2884-2889.
- Davidson, A.P. & Stabenfeldt, G.H. (2013). The mammary gland. In Klein, B.G. (Ed.), *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*. (5th ed.). (pp.439-443). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders
- De Boer, M., van Dijck, J.A.A.M., Bult, P., Borm, G.F. & Tjan-Heijnen, V.C.G. (2010). Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute*, 102 (6), 410-425.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N. & Coussens, L.M. (2009). CD4⁺ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*, 16, 91-102.
- Desouki, M.M., Post, G.R., Cherry, D. & Lazarchick, J. (2010). PAX-5: a valuable immunohistochemical marker in the differential diagnosis of lymphoid neoplasms. *Clinical Medicine & Research*, 8(2), 84-88.

- DeTora, M. & McCarthy, R.J. (2011). Ovariohysterectomy versus ovariectomy for elective sterilization of female dogs and cats: is removal of the uterus necessary?. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239 (11), 1409-1412.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L.N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43, 240–246.
- Doré M. (2011). Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *Veterinary Pathology*, 48(1), 254-265.
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., Euler, H. (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 109–127.
- Eiró, N., Pidal, I., Fernandez-Garcia, B., Junquera, S., Lamelas, M.L., Casar, J.M., González, L.O., López-Muñiz, A. & Vizoso, F.J. (2012). Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS ONE*, 7(12), e52796.
- Elston, C.W. & Ellis I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403-10.
- Enginler, S.O., Akış, I., Toydemir, T. S. F., Oztabak, K., Haktanir, D., Gündüz, M.C., Kırşan, I. & Fırat, I. (2014). Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Veterinary Research Communication*, 38, 21–27.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M.S.S., Costa-Neto, J.M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S., 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(256), 1-14.
- Eubank, T.D., Roberts, R.D., Khan, M., Curry, J.M., Nuovo, G.J., Kuppusamy, P. & Marsh, C.B. (2009). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits breast cancer growth and metastasis by invoking an anti-angiogenic program in tumor-educated macrophages. *Cancer Research*, 69(5), 2133-2140.
- Euler, H. (2011). Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. Lascelles, *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (3th Ed.)
- Evans, H.E. & de Lahunta, A. (Eds.). (2013). *Miller's anatomy of the dog*. (4th ed.). St.Louis, Missouri: Saunders.
- Ežerskytė, A., Zamokas, G. Grigonis, A., Juodžiukynienė (2011). The retrospective analysis of mammary tumours in dogs. *Veterinary Medicine and Zootechnics*, 75, 3-8.
- Filho, J.C.O., Kommers, G.D., Masuda, E.K., Marques, B.M.F.P.P., Figuera, R.A., Irigoyen, L.F. & Barros, C.S.L. (2010). Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(2), 177-185.

- Foster, R.A. (2007). Female reproductive system. In McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4th ed.). (pp.1264-1308). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Frey, D.M., Drosner, R.A., Viehl, C.T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., Oertli, D., Kettelhack, C., Terracciano, L. & Tornillo, L. (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*, 126, 2635-2643.
- Galdiero, M.R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A. & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218, 1402-1410.
- Gao, Q., Qiu, S.-J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.-Y., Xiao, Y.-S., Xu, Y., Li, Y.-W. & Tang, Z.-Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology*, 25(18), 2586-2593.
- Gentschev, I., Stritzker, J., Hofmann, E., Weibel, S., Yu, Y.A., Zhang, Q., Bullerdiek, J., Nolte, I. & Szalay, A.A. (2009). Use of an oncolytic vaccinia virus for the treatment of canine breast cancer in nude mice: preclinical development of a therapeutic agent. *Cancer Gene Therapy*, 16(4), 320-328.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011) Classification and grading of canine mammary tumors, *Veterinary Pathology*, 48 (1), 117–131.
- Gooden, M.J.M., Bock, G.H., Leffers, N., Daemen, T. & Nijman, H.W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 105, 93-103.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 883-899.
- Guil-Luna, S., Sánchez-Céspedes, R., Millán, Y., De Andrés, F.J., Róllon, E., Domingo, V., Guscetti, F. & Martín de Las Mulas, J., (2011). Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, 518–523.
- Gutierrez, C. & Schiff R. (2011). HER-2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135 (1), 55-62.
- Haas, M., Dimmler, A., Hohenberger, W., Grabenbauer, G.G., Niedobitek, G. & Distel, L.V. (2009). Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BioMed Central Gastroenterology*, 9(6).
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Henry, J.C., Downing, S., Rosenthal, R.C., Klein, M. K., Meleo, K., Villamil, J.A., Fineman, L.S., McCaw, D.L., Higginbotham, M.L. & McMichael, J. (2007). Evaluation of a novel immunomodulator composed of human chorionic gonadotropin and bacillus Calmette-Guerin

- for treatment of canine mast cell tumors in clinically affected dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 68, 1246-1251.
- Horta, R.S., Lavallo, G.E., Cunha, R.M.C., Moura, L.L., Araújo, R.B. & Cassali, G.D. (2014). Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. *Advances in Breast Cancer Research*, 3, 38-46.
- Hussain, M., Javeed, A., Ashraf, M., Al-Zaubai, N., Stewart, A. & Mukhtar, M.M. (2012). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. *Pharmacological Research*, 66(1), 7-18
- Im, K-S., Kim, I-H., Kim, N-H., Lim, H-Y., Kim, J-H. & Sur, J-H. (2013). Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *The Veterinary Journal*, 195, 366–372.
- Im, K.S., Kim, N.H., Lim, H.Y., Kim, H.W., Shin, J.I. & Sur, J.H. (2014). Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Veterinary Pathology*, 51(3), 549-559.
- Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H. & Shii, H. (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(3), 345-347.
- Jaillardon, L., Barthélemy, A., Goy-Thollot, I., Pouzot-Nevoret, C. & Fournel-Fleury. (2012). Mammary gland carcinoma in a dog with peripheral blood and bone marrow involvement associated with disseminated intravascular coagulation. *Veterinary Clinical Pathology*, 41, 261-265.
- Johnson, C.A. (2009). Postpartum and mammary disorders. In: R.W. Nelson & C.G. Couto (Eds.), *Small animal internal medicine*. (4th ed.). (pp. 948-949). St. Louis, Missouri, USA: Mosby Elsevier.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2008). Aparelho reprodutor feminino. In L. C., Junqueira & J., Carneiro (Eds), *Histologia básica* (11ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 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.
- Kato, Y., Asano, K., Mogi, T., Kutara, K., Teshima, K., Edamura, K., Tsumagari, S., Hasegawa, A. & Tanaka, S. (2007). Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 69(1), 77-80.
- Kawai, O., Ishii, G., Kubota, K., Murata, Y., Naito, Y., Mizuno, T., Aokage, K., Saijo, N., Nishiwaki, Y., Gemma, A., Kudoh, S. & Ochiai, A. (2008). Predominant infiltration of macrophages and cd8⁺ T cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 113(6), 1387-1395.

- Kim, J.-H., Chon, S.-K., Im, K.-S., Kim, N.-H. & Sur, J.-H. (2013). Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: a morphologic and immunohistochemical morphometric study. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 77, 142-149.
- Kim, J.-H., Hur, J.-H., Lee, S.-M., Im, K.-S., Kim, N.-H. & Sur, J.H. (2012). Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. *The Veterinary Journal*, 193, 222-227.
- Kim, J.-H., Im, K.-S., Kim, N.-H., Chong, S.-K., Doster, A.R. & Sur, J.-H. (2011). Inflammatory mammary carcinoma with metastasis to the brain and distant organs in a spayed shih tzu dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5), 1079-1082.
- Kim, N.-H., Lim, H.-Y., Im, K.-S., Shin, J.-I., Kim, H.-W. & Sur, J.-H. (2014). Evaluation of Clinicopathological Characteristics and Oestrogen Receptor Gene Expression in Oestrogen Receptor-negative, Progesterone Receptor-positive Canine Mammary Carcinomas. *Journal of Comparative Pathology*, 151, 42-50.
- Kim, J.H., Yu, C.H., Yhee, J.Y., Im, K.S. & Sur, J.H. (2010). Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 142, 177-186.
- King, J., Waxman, J. & Stauss, H. (2008). Advances in tumour immunotherapy. *QJM: An International Journal of Medicine*, 101, 675-683.
- Klopfleisch, R., Euler, H., Sarli, G., Pinho, S.S., Gärtner, F. & Gruber, A.D. (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from and old disease. *Veterinary Pathology*, 48(1), 98-116.
- Kusewitt, D.F. & Rush, L.J. (2007). Neoplasia and tumor biology. In M.D. McGavin & J.P. Zachary (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4th ed.). (pp. 253-298). Missouri: Mosby Elsevier.
- Kustritz, M.V.R. (2007). Determining the optimal age for gonadectomy of dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231 (11), 1665-1675.
- Lavalle, G.E., Bertagnolli, A.C., Tavares, L.F. & Cassali, G.D. (2009). Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46, 1275–1280.
- Leffers, N., Gooden, M.J.M., de Jong, R.A., Hoogeboom, B.-N., ten Hoor, K.A., Hollema, H., Boezen, H.M., van der Zee, A.G.J., Daemen, T. & Nijman, H.W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 58, 449-459.
- Liggett, J.L., Zhang, X., Eling, T.E. & Baek, S.J. (2014). Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Letters*, 346, 217–224.
- Lin, Y.-C., Huang, Y.-C., Wang, Y.-S., Juang, R.-H., Liao, K.-W. & Chu, R.-M. (2010). Canine CD8 T cells showing NK cytotoxic activity express mRNAs for NK cell-associated surface molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133, 144-153.

- Lombardi, P., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A. & Avallone, L. (1999). Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 22, 56-61.
- Loughlin, P.M., Cooke, T.G., George, W.D., Gray, A.J., Stott, D.I. & Going, J.J. (2007). Quantifying tumour-infiltrating lymphocyte subsets: a practical immuno-histochemical method. *Journal of Immunological Methods*, 321(1-2), 32-40.
- Macphail, C.M. (2013) Surgery of the Reproductive and Genital Systems – Mammary Neoplasia. In T.W. Fossum, C.W Dewey, C.V. Horn, A.L. Johnson, C.M. Macphail, M.G. Radlinsky, K. S. Schulz, M. D. Willard (Eds.), *Small animal surgery*. (4th Ed.). (pp. 809-815). St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby
- Mahmoud, S.M.A., Paish, E.C.P., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H.S., Ellis, I.O. & Green, A.R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (15), 1949-1955.
- Maia, S. & Cardoso, A.A. (2012). Imunologia tumoral. In F.A. Arosa, F.C. Pacheco & E.M. Cardoso, *Fundamentos de Imunologia* (2^a Ed.). Lisboa: Lidel.
- Mantovani, A. & Locati, M. (2013). Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 1478-1483.
- Martín de las Mulas, J., Millán, Y. & Dios, R. (2005). A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, 42, 200-212.
- Marsigliante, S., Biscozzo, L., Marra, A., Nicolardi, G., Leo, G., Lobreglio, G.B. & Storelli, C. (1999). Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Letters*, 139, 33-41.
- Matkowski, R., Gisterek, I., Halon, A., Lacko, A., Szewczyk, K., Staszek, U., Pudelko, M., Szynglarewicz, B., Szelachowska, J., Zolnierok, A. & Kornafel, J. (2009). The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Research*, 29, 2445-2452.
- McGeady, T.A. (2006). Male and female reproductive systems – development of the mammary gland. In T.A., McGeady, P.J., Quinn, E.S., FitzPatrick, & M.T. Ryan, *Veterinary embryology*. (pp. 263-267). Oxford: Blackell Publishing.
- Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. & Poli, A. (2006). COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research Treatment*, 98, 115–120.
- Milne, K., Köbel, M., Kalloger, S.E., Barnes, R.O., Gao, D., Gilks, C.B., Watson, P.H. & Nelson, B.H. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS ONE*, 4(7), e6412.

- Misdorp, W., Else, R.W., Hellmen, E. & Lipscomb, T.P. (1999). *Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat*, 2nd ser., vol. 7. Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization, Washington, DC. Missouri: Saunders Elsevier.
- Misdorp, W. (2002). Tumors of the mammary gland. In D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th ed.). (pp. 575-588). Iowa: Iowa State Press.
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D. & Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25.
- Miyashita, M., Sasano, H., Tamaki, K., Chan, M., Hirakawa, H., Suzuki, A., Tada, H., Watanabe, G., Nemoto, N., Nakagawa, S., Ishida, T. & Ohuchi, N. (2014). Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triplenegative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Research Treatment*, 148, 525-534.
- Monteiro-Riviere, N.A. (1998). Integument. In H.D. Dellmann & J. Eurell (Eds.), *Textbook of Veterinary Histology* (5th ed). Pensilvania: Lippincott Williams and Wilkins.
- Morrison, W.B. (2012). Inflammation and cancer: a comparative view. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26, 18-31.
- Murphy, S. (2008). Mammary tumours in dogs and cats. *In Practice*, 30, 334-339.
- Myers, R.K. & McGavin, M.D. (2007). Cellular and tissue responses to injury. In McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. (4th ed.). (pp.47-48). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Oldford, S.A. & Marshall, J.S. (2015). Mast cells as targets for immunotherapy of solid tumors. *Molecular Immunology*, 63, 113-124.
- Olkhanud, P.B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R.E., Sen, R., Wejksza, K., Malchunghuu, E., Wersto, R.P. & Biragyn, A. (2011) Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4(+) T cells to Tregulatory cells. *Cancer Research*, 71, 3505–3515.
- Ostrovich, K.K., Lambertz, I., Colby, J.K.L., Tian, J., Rundhaug, J.E., Johnston, D., Conti, C.J., DiGiovanni, J. & Fuchs-Young, R. (2008). Paracrine overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances mammary tumorigenesis *in vivo*. *The American Journal of Pathology*, 173 (3), 824-834.
- Owen, L. (1980) *TNM classification of tumors in domestic animals*, World Health Organization, Geneva.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 89, 10-34.
- Peleteiro, C., Branco, S. & Correia, J. (1996). Estudo epidemiológico de tumores mamários em cadela. In *Proceedings da VIII Reunião de la SEAPV*, Córdoba, Espanha, Junho, pp.66.

Peleteiro, M.C. & Carvalho, T. (2011). Glândula mamária. In Peleteiro, M.C., Marcos, R., Santos, M., Correia, J., Pissarra, H. & Carvalho, T., *Atlas de Citologia Veterinária*. (pp.215-230). Lisboa: LIDEL - Edições técnicas.

Peleteiro, M.C., Niza, M., Ferreira, L., Carreira, M., Correia, J., Carvalho, T., Pissarra, H. & Figueiredo, R. (2009). The value of cytology in the diagnosis of mammary tumors in dog and cat. In *Abstracts of the 35th european congress of cytopathology, Lisboa, Portugal, 27-30 of september 2009*, Wiley-blackwell, 20 (1), p. 156.

Peña, L., De Andrés, P.J., Clemente, M., Cuesta, P. & Pérez-Alenza, M.D. (2013). Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. *Veterinary Pathology*, 50(1), 94-105.

Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M.H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M., Díez, L., Gärtner, F., Hellmén, E., Kiupel, M., Millán, Y., Miller, M.A., Nguyen, F., Poli, A., Sarli, G., Zappulli, V. & de las Mulas, J.M. (2014). Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 51(1), 127-145.

Pereg, D. & Lishner, M. (2005). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. *Journal of Internal Medicine*, 258, 115–123.

Peruzzi, D., Mesiti, G., Ciliberto, G., La Monica, N., Aurisicchio, L. (2010). Telomerase and HER-2/neu as targets of genetic cancer vaccines in dogs. *Vaccine*, 28 1201–1208.

Pinho, M.S. & Gulbenkian, S. (2007). Innervation of the canine mammary gland: and immunohistochemical study. *Histology and Histopathology*, 22, 1175-1184.

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

Queen, M.M., Ryan, R.E., Holzer, R.G., Keller-Peck, C.R. & Jorcyk, C.L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896-8904.

Queiroga, F.L., Pires, I., Lobo, L. & Lopes, C.S. (2010). The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Research Veterinary Science*, 88, 441-445.

Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005). Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research*, 25, 4269-4275.

Raffaella, B., Locati, M. & Mantovani, A. (2011). Chemokines and cancer: a fatal attraction. *Cancer Cell*, 19, 434-435.

Rajput, A.B., Turbin, D.A., Cheang, M, Voduc, D.K., Leung, S., Gelmon, K.A., Gilks, C.B. & Huntsman, D.G. (2008). Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107, 249-257.

- Rakha, E.A., Aleskandarany, M., El-Sayed, M.E., Blamey, R.W., Elston, C.W., Ellis, I.O. & Lee, A.H.S.. (2009). The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *European Journal of Cancer*, 45, 1780-1787.
- Raposo, T.P., Pires, I., Carvalho, M.I., Prada, J., Argyle, D.J. & Queiroga, F.L. (2013). Tumour-associated macrophages are associated with vascular endothelial growth factor expression in canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11.
- Rasotto, R., Zappulli, V., Castagnaro, M. & Goldschmidt, M.H. (2012). A retrospective study of those histopathologic parameters predictive of invasion of the lymphatic system by canine mammary carcinomas. *Veterinary Pathology*, 49 (2), 330-340.
- Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E., Tan-Chiu, E., Martino, A., Paik, S., Kaufman, P.A., Swain, S.M., Pisansky, T.M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L.A., Vogel, V.G., Visscher, D.W., Yothers, G., Jenkins, R.B., Brown, A.M., Dakhil, S.R., Mamounas, E.P., Lingle, W.L., Klein, P.M., Ingle, J.N. & Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 353 (16), 1673-1684.
- Saini, K.S., Azim, H.A., Metzger-Filho, O., Loi, S., Sotiriou, C., de Azambuja, E., Piccart, M. (2011). Beyond trastuzumab: new treatment options for HER-2-positive breast cancer. *The Breast*, 20, 20-27.
- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C. & Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2), 186-192.
- Samoszuk, M., Kanakubo, E. & Chan, J.K. (2005). Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*, 5(121).
- Santos, M., Correia-Gomes, C., Santos, A., Matos, A., Rocha, E., Lopes, C. & Pereira, P.D. (2014). Nuclear pleomorphism: role in grading and prognosis of canine mammary carcinomas. *The Veterinary Journal*, 200, 426–433.
- Sasaki, A., Tanaka, F., Mimori, K., Inoue, H., Kai, S., Shibata, K., Ohta, M., Kitano, S. & Mori, M. (2008). Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, 34, 173-179.
- Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R.G., Rosser, E.C., Kulbe, H., Nedospasov, S., Mauri, C., Coussens, L.M. & Balkwill, F.R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (26), 10662-10667.
- Schneider, R., Dorn, C.R & Taylor, D.O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *Journal of the National Cancer Institute*, 43,1249-1261.
- Sheu, B.-C., Kuo, W.-H., Chen, R.-J., Huang, S.-C., Chang, K.-J. & Chow, S.-N. (2008). Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. *The Breast*, 17, 604-610.

- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W. & Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 1184 – 1190.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., Mischke, R. (2009) Cytologic examination of fine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, 521–528.
- Simonson, W.T. & Allison, K.H. (2010). Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Diagnostic Histopathology*, 17(2), 80-90.
- Singer, J., Weichselbaumer, M., Stockner, T., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., Bajna, E., Wrba, F., Horvat, R., Thalhammer, J.G., Willmann, M. & Jensen-Jarolim, E. (2012). Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Molecular Immunology*, 20, 200-209.
- Sleeckx, K., Rooster, H., Kroeze, E.J.B.V., Van Ginneken, C. & Van Brantegem, L. (2011) Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 1112-1131.
- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teige, J. & Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumors; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary Comparative Oncology*, 7, 162–172.
- Sorenmo, K.U., Rasotto, R., Zappulli, V. & Goldschmidt, M.H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85-97.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R. Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow, Vail, D.M., Page, R.L. *Small animal clinical oncology* (5th Ed) Missouri:Elsevier Saunders.
- Souza, C.H.M., K.M. (2009). Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. *Canadian Veterinary Journal*, 50(5), 506–510.
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A. & Wehrend, A. (2008). Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Veterinary Surgery*, 37, 82-86.
- Szczubiał, M. & Łopuszynski, W. (2011). Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9 (4), 296–303
- Tizard, I.R. (Ed.) (2013). *Veterinary immunology*. (9th ed.). St.Louis, Missouri: Elsevier Mosby.
- Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: na old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annual Review of Immunology*, 30, 677-706.
- Ulrich, C.M., Bigler, J. & Potter, J.D. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer*, 6, 130–140.
- Walter, C.U., Biller, B.J., Lana, S.E., Bachand, A.M. & Dow, S.W. (2006). Effects of chemotherapy on immune responses in dogs with cancer. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 342-347.

Weeth, L.P., Fascetti, A.J., Kass, P.H., Suter, S.E., Santos, A.M. & Delaney, S.J. (2007). Prevalence of obese dogs in a population of dogs with cancer. *American Journal of Veterinary Research*, 68 (4), 389-398.

West, N.R., Kost, S.E., Martin, S.D., Milne, K., deLeeuw, R.J., Nelson, B.H. & Watson, P.H. (2013). Tumour-infiltrating FOXP3+ lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *British Journal of Cancer*, 108, 155–162.

Wolf, G.T., Chepeha, D.B., Bellile, E., Nguyen, A., Thomas, D. & McHugh, J. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. *Oral oncology*, 51, 90-95.

Zayas, A.E.M., Rodríguez, A.F., Thomas, P.H. & Guisado, F.R. (2004). Piel y anejos cutáneos. In A. R. Blanco & A. G. Ortiz (Eds.), *Tratado de histología veterinaria*. (pp. 413-414). Barcelona: Masson.

VII. Anexos

Anexo 1

Teste exato de Fisher para associações presuntivas entre variáveis clínicas e anatomopatológicas (n=41).

	Grau de malignidade ¹	Necrose (S/N)	Infiltrado linfoide ²	Ulceração (S/N)	Permeação Vascular (S/N)	Dimensão tumoral ³
Idade	0,545	0,966	0,275	0,090	0,098	0,888
Raça	0,368	0,396	0,260	0,634	0,390	0,056
Esterilização (S/N) ⁴	0,562	0,542	0,251	0,316	0,171	0,824
Localização ⁵	0,820	0,937	0,338	0,673	0,805	0,722
Malignidade (S/N)	N.A.	1	0,088	1	1	0,809
Simples/Complexo ⁶	0,134	0,637	0,621	0,512	1	0,006 ⁷
Misto (S/N) ⁶	0,194	1	0,909	1	1	0,697
Subtipo histológico ⁶	0,007	0,325	0,602	1	0,488	0,279
Grau de malignidade ¹	N.A.	0,069	0,134	0,731	0,257	0,025
Dimensão tumoral ³	0,025	0,253	0,073	0,572	0,341	N.A.

Legenda: S/N – Sim/não;

- ¹⁻ Grau de malignidade segundo o sistema de classificação de Elston & Ellis (1991) para n=35, isto é, somente os carcinomas.
- ²⁻ Consideradas 4 categorias semi-quantitativas para quantificar o infiltrado linfoide: ausente, escasso, moderado e abundante
- ³⁻ Consideradas 3 categorias de dimensão tumoral: T1 (< 3cm), T2 (3-5cm) e T3 (>5cm).
- ⁴⁻ Cadelas sujeitas ao procedimento cirúrgico no período temporal anterior à cirurgia.
- ⁵⁻ Localização das massas ao nível da cadeia mamária (mamas e pares de mamas).
- ⁶⁻ Quanto ao diagnóstico histopatológico foram considerados adenomas/carcinomas simples *versus* complexos, adenomas/carcinomas mistos ou não e 4 subtipos histológicos de adenomas/carcinomas mamários (tubular, túbulo-papilífero, sólido e de células escamosas)
- ⁷⁻ Para a mesma, considerando apenas os carcinomas (n=35), verificou-se um valor de p=0,046.

Anexo 2

Correlações de Spearman entre os resultados obtidos (n=13).

Percentagem de células com marcação positiva: anticorpo anti-CD3 × anticorpo anti-PAX5.

			%cd3pos	%Pax5pos
Ró de Spearman	%cd3pos	Coeficiente de Correlação	-	-,308
		Sig. (2 extremidades)	-	,306
		N	-	13
	%Pax5pos	Coeficiente de Correlação	-,308	-
		Sig. (2 extremidades)	,306	-
		N	13	-

Densidade linfocitária: células positivas anticorpo anti-CD3/UA × células positivas anticorpo anti-PAX5/UA.

			Dens_cd3	Dens_pax5
ró de Spearman	Dens_cd3	Coeficiente de Correlação	-	,236
		Sig. (2 extremidades)	-	,437
		N	-	13
	Dens_pax5	Coeficiente de Correlação	,236	-
		Sig. (2 extremidades)	,437	-
		N	13	-

Percentagem de células com marcação positiva × Rácio densidade linfocitária

			RacioCD3/PAX5	RacioPAX5/CD3
Rô de Spearman	Percentagem_cd3pos	Coeficiente de Correlação	,621	-,621
		Sig. (2 extremidades)	,024	,024
		N	13	13
	Percentagem_paxpos	Coeficiente de Correlação	-,725	,725
		Sig. (2 extremidades)	,005	,005
		N	13	13

Anexo 3

Valores da densidade do infiltrado linfoide por mm² (n=13).

Classificação histológica dos carcinomas mamários	Grau de malignidade	Anti-CD3	Anti-PAX5
Simple tubular	III	6200,00	4408,50
Simple túbulo-papilífero	II	4383,50	3808,50
Espinocelular	III	4466,50	6066,50
Simple túbulo-papilífero	II	5341,50	5658,50
Complexo tubular	I	5208,50	5175,00
Simple tubular	I	3941,50	7166,50
Complexo tubular	II	5308,50	7041,50
Simple sólido	III	7125,00	10758,50
Complexo túbulo-papilífero	II	2241,50	5466,50
Simple sólido	III	7166,50	6033,50
Complexo tubular	I	4583,50	5258,50
Simple túbulo-papilífero	III	6466,50	4383,50
Simple tubular	II	3508,50	1883,50

Anexo 4 – Teste exato de Fisher para associações presuntivas entre variáveis clínico-patológicas (N=13). Valores de significância exata (2 lados).

	Grau de malignidade ¹	Necrose (S/N)	Ulceração (S/N)	Permeação Vascular (S/N)	Dimensão tumoral ²
Idade	0,756	0,538	0,218	0,231	0,944
Raça	1	1	0,538	0,308	0,523
Esterilização (S/N) ³	1	0,308	1	0,308	0,462
Localização ⁴	0,556	1	0,115	0,308	0,375
Simple/Complexo ⁵	0,196	0,308	1	1	0,119
Misto (S/N) ⁵	0,028	0,308	1	1	0,119
Tipo histológico ⁵	0,179	0,538	1	0,538	0,452
Grau de malignidade ¹	N.A.	1	1	1	0,213
Dimensão tumoral ³	0,213	1	0,282	0,462	N.A.

Legenda: S/N – Sim/não;

- ¹⁻ Grau de malignidade segundo o sistema de classificação de Elston & Ellis (1991).
- ²⁻ Consideradas 3 categorias de dimensão tumoral: T1 (< 3cm), T2 (3-5cm) e T3 (>5cm).
- ³⁻ Cadelas sujeitas ao procedimento cirúrgico no período temporal anterior à cirurgia.
- ⁴⁻ Localização das massas ao nível da cadeia mamária (mamas e pares de mamas).
- ⁵⁻ Quanto ao diagnóstico histopatológico foram considerados carcinomas simples *versus* complexos, carcinomas mistos ou não e 4 subtipos histológicos de carcinomas mamários (tubular, túbulo-papilífero, sólido e de células escamosas)

Anexo 5

Correlação com aspetos clínico-patológicos (anticorpo anti-CD3) (n=13).

Tipo de teste	Células positivas/UA <i>versus</i>	Significância	Decisão
Kruskal-Wallis	Idade	0,769	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Raça	0,644	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Esterilização(S/N) ¹	0,825 ¹	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Localização ²	0,507	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	CM complexo x simples ³	0,414	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	CM misto (S/N) ³	0,106 ¹	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Subtipo histológico ³	0,187	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Grau de malignidade ⁴	0,063	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Dimensão tumoral ⁵	0,339	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Necrose	0,154	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Ulceração	1	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Permeação vascular	0,462	Reter a hipótese nula.

Legenda: S/N – Sim/não; UA – Unidade de área; CM – Carcinoma mamário

1-Cadelas sujeitas ao procedimento cirúrgico no período temporal anterior à cirurgia.

2-Localização das massas ao nível da cadeia mamária (mamas e pares de mamas).

3-Quanto ao diagnóstico histopatológico foram considerados carcinomas simples versus complexos, carcinomas mistos ou não e 4 subtipos histológicos de carcinomas mamários (tubular, túbulo-papilífero, sólido e de células escamosas)

4-Grau de malignidade segundo o sistema de classificação de Elston & Ellis (1991).

5-Consideradas 3 categorias de dimensão tumoral: T1 (< 3cm), T2 (3-5cm) e T3 (>5cm).

Anexo 6

Correlação com aspetos clínico-patológicas (anticorpo anti-PAX5) (n=13).

Tipo de teste	Células positivas/UA <i>versus</i>	Significância	Decisão
Kruskal-Wallis	Idade	0,343	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Raça	0,621	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Esterilização(S/N) ¹	1	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Localização ²	0,323	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	CM complexo x simples ³	1	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	CM misto (S/N) ³	0,825	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Subtipo histológico ³	0,277	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Grau de malignidade ⁴	0,679	Reter a hipótese nula.
Kruskal-Wallis	Dimensão tumoral ⁵	0,171	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Necrose	1	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Ulceração	0,051	Reter a hipótese nula.
Mann-Whitney U	Permeação vascular	0,462	Reter a hipótese nula.

Legenda: S/N – Sim/não; UA – Unidade de área; CM – Carcinoma mamário

1-Cadelas sujeitas ao procedimento cirúrgico no período temporal anterior à cirurgia.

2-Localização das massas ao nível da cadeia mamária (mamas e pares de mamas).

3-Quanto ao diagnóstico histopatológico foram considerados carcinomas simples versus complexos, carcinomas mistos ou não e 4 subtipos histológicos de carcinomas mamários (tubular, túbulo-papilífero, sólido e escamoso)

4-Grau de malignidade segundo o sistema de classificação de Elston & Ellis (1991).

5-Consideradas 3 categorias de dimensão tumoral: T1 (< 3cm), T2 (3-5cm) e T3 (>5cm).