

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS
TRÓPICOS

AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS (RAZÃO
DE CELULAS T CD4⁺/CD8⁺ E EXPRESSÃO DE MHC I POR
MONÓCITOS) EM CADELAS COM CARCINOMAS MAMÁRIOS

MARIO JORGE MELHOR HEINE D'ASSIS

SALVADOR – BA

AGOSTO – 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS
TRÓPICOS

AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS (RAZÃO
DE CELULAS T CD4⁺ / CD8⁺ E EXPRESSÃO DE MHC I POR
MONÓCITOS) EM CADELAS COM CARCINOMAS MAMÁRIOS

MARIO JORGE MELHOR HEINE D'ASSIS

Médico Veterinário

SALVADOR – BA

AGOSTO – 2017

MARIO JORGE MELHOR HEINE D'ASSIS

**AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS
(RAZÃO DE CELULAS T CD4⁺ / CD8⁺ E EXPRESSÃO DE MHC I
POR MONÓCITOS) EM CADELAS COM CARCINOMAS
MAMÁRIOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima

Coorientador: Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso

Prof. Dr. João Moreira da Costa Neto

SALVADOR – BA

AGOSTO – 2017

AGRADECIMENTOS

Eu sou um goleiro. Só uma peça do time com a função de defender, mas, que sem a equipe, é somente uma peça solta...

Nossa ciência se faz em equipe. Agradeço muito e compartilho, como de direito, esse estudo com toda equipe do “projeto mama”, no qual todos são importantes e, por isso, um time forte. Em especial a Marilia, Guga, Aline, Laís, Humbertinho, Dani e ultra especialmente a nossa capitã, técnica e centro-avante Dra. Alessandra Estrela, a responsável por esse grupo aguerrido.

Agradeço à comissão técnica, ao Dr. Tiago Marconi e Dra. Karine Damasceno da FIOCRUZ, que nos ajudou e abriu as nossas mentes e a FAPESB pelo financiamento.

À Juju que chefiou a torcida e sempre apoiou da arquibancada.

“O mar, quando quebra na praia, é bonito, é bonito...”

Dorival Caymmi.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa. Grupo 1, correspondente ao grupo controle, constituído por cadelas hígidas; Grupo 2, cadelas com MCT, subdivididas em tratamento com cirurgia e tratadas com cirurgia e quimioterapia. Grupo 3, cadelas com MC, subdivididas em tratamento com cirurgia e; tratados com cirurgia e quimioterapia.	32
Figura 2. Avaliação clínica, mastectomia e procedimento quimioterápico em cadelas com carcinoma mamário. A e B. Anamnese e exame físico em cadela com neoplasia mamária atendida no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. C e D. Procedimento cirúrgico (mastectomia radical unilateral) com retirada dos linfonodos inguinais em cadela com tumor mamário. E. Cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina endovenosa.	33
Figura 3. Fotomicrografia, HE, Carcinoma mamário: A) Grupo MCT, Carcinoma em Tumor Misto Grau I: proliferação neoplásica de crescimento infiltrativo caracterizada por formação tubular, por vezes, papilar, associada à discreta produção de matriz mixóide, sustentada por um estroma moderado. 100x. B) Detalhe de A, pequenos aglomerados de células epiteliais focais (seta), discretamente pleomórficas invadindo o estroma adjacente.400x. C) Grupo MCT, Carcinoma em Tumor Misto Grau II: Proliferação de células epiteliais de crescimento infiltrativo, caracterizada por formação tubular, associada à moderada produção de matriz mixóide, sustentadas por um estroma escasso. 100x. D) Detalhe de C, formações de cordões e aglomerados de células epiteliais, moderadamente pleomórficas (seta menor), invadindo o estroma adjacente com presença de mitose atípica (seta maior), 400x. E) Grupo MC, Carcinoma Sólido: Proliferação neoplásica de crescimento infiltrativo caracterizada pela formação de aglomerados sólidos sustentados por estroma conjuntivo desenvolvido. 200x.; F) Detalhe de E, aglomerado sólido de células epiteliais (seta) moderadamente pleomórficas, 400x	37

- Figura 4. Subconjuntos de leucócitos no sangue periférico de cadelas com carcinomas mamários.** A análise de dados foi realizada em cães saudáveis (controle), cadelas com carcinomas em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC). As análises imunofenotípicas foram realizadas por citometria de fluxo de três cores. Os linfócitos totais foram selecionados pela primeira vez com base em seu tamanho (dispersão a laser-frente-FSC) e granulosidade (dispersão lateral do laser-SSC) e subconjuntos analisados por estatísticas do quadrante em FL1 / FITC, FL2 / R-PE e FL3 / PE-Cy-5 dots plots. Os resultados são mostrados no formato do gráfico de caixa mostrando valores de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por um asterisco, $p < 0,01$ são indicadas por dois asteriscos e $p < 0,001$ são indicados por três asteriscos 48
- Figura 5. Imunofenotipagem de sangue periférico de cadelas.** Avaliação da frequência e índice médio de fluorescência de células CD14⁺ e expressão de receptores MHC I e MHC II. A análise de dados foi realizada em cadelas saudáveis (Controle) e cadelas com carcinomas em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC). As análises imunofenotípicas foram realizadas por citometria de fluxo de três cores. Os resultados são mostrados no formato do box plot apresentando valores de CD14⁺, IMF CD14⁺MHC I e IMF CD14⁺MHC II. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por um asterisco, $p < 0,01$ são indicadas por dois asteriscos e $p < 0,001$ são indicados por três asteriscos 53
- Figura 6. Relação entre graduação histopatológica e porcentagem dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico de cadelas do grupo MCT.** Análise da relação entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do grupo MCT e a graduação histopatológica dos tumores, divididos em Grau1(G1) e Grau 2 (G2). Diferenças significativas ocorre quando $p < 0,05$, sendo destacadas por asterisco 55

- Figura 7. Relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT).** O valor da razão CD4⁺/CD8⁺ para prever a progressão da doença para a sobrevivência ou a morte em cães do sexo feminino com MCT foi avaliada usando vários índices de desempenho, incluindo segregação em gráficos de dispersão, índices de curva de ROC usando um corte específico, incluindo: Área Sob a Curva / segurança global (AUC), Co-positividade (Co-pos), Co-negatividade (Co-neg) 57
- Figura 8. Relação IMF de CD14/MHC-I no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT).** O valor da razão IMF MHC-I/CD14 para prever a progressão da doença para a sobrevivência ou a morte em cães do sexo feminino com MCT foi avaliada usando vários índices de desempenho, incluindo segregação em gráficos de dispersão, índices de curva de ROC usando um corte específico, incluindo: Área Sob a Curva / segurança global (AUC), Copositividade (Co-pos), Co-negatividade (Co-neg). 58
- Figura 9. Relação entre sobrevida e tratamento com quimioterapia em cadelas com carcinomas mamários.** Análise da relação entre sobrevida e animais tratados ou não tratados. E análise de sobrevida e tratamento de cadelas com MCT e MC subdivididas em dois subgrupos tratadas e não tratadas. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por um asterisco 62
- Figura 10. Taxas de sobrevida de animais com carcinoma mamário canino.** Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para animais com carcinoma em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC) subdivididos em dois grupos: tratados e não tratados. Diferenças significativas em $p < 0,05$ destacado por um asterisco. 62
- Figura 11. Relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT).** Sobrevida média entre cadelas com MCT segregados em dois grupos com ponto de corte em 1.8. Os grupos foram comparados pelo Test “t” de Student, sendo representados por média \pm erro padrão. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por * asterisco. 63

Figura 12. Relação IMF de MHC-I/CD14 no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT) submetidas a quimioterapia. A média de sobrevida, apresentada como média \pm erro padrão foi comparada entre cadelas com MCT segregados em dois grupos de acordo com o IMF de MHC-I/CD14. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por asterisco

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular em sangue periférico de cadelas portadoras de carcinomas mamários	38
Tabela 2. Características clínicas e patológicas de carcinomas mamários em cadelas, atendidas no período de março de 2014 a fevereiro de 2016 no HOSPMEV/UFBA Salvador – Ba	46
Tabela 3. Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos associados a razão de $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ ou $>1,8$	60
Tabela 4. Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos associados ao IMF ≤ 100 ou >100	60

LISTA DE SIGLAS

Ag antígeno

ALT Alanina aminotransferase

CD Cluster de diferenciação

CD4⁺ Marcador de superfície celular de linfócitos T auxiliares

CD8⁺ Marcador de superfície celular de linfócito T citotóxico

Células NK Células natural killer (células assassinas naturais)

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CM Carcinoma mamário

CTM Carcinoma de tumor misto

COX-2 Cicloxigenase 2

DNA Ácido desoxirribonucleico

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR Expressão do receptor do fator de crescimento

EMEVZ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia

FA Fosfatase alcalina

FAS-L FAS Ligante

FIOCRUZ Fundação Osvaldo Cruz

FITC Isotiocianato de fluoresceína

FL1 Fluorescência tipo 1

FL2 Fluorescência tipo 2

FL3 Fluorescência tipo 3

FoxP3 Forkhead box protein 3

FSC Forward scatter

HE Hematoxilina Eosina

HER-2 Receptor de crescimento epidérmico

IFN- γ Interferon gama

IL Interleucina

IMF Intensidade Média de Fluorescência

LACEI Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular

LAPEX Laboratório de Patologia Experimental
LLD Látero lateral direito
LLE Látero lateral esquerdo
MAC Complexo de ataque a membrana
M1 Macrófagos tipo 1
M2 Macrófagos tipo 2
M-CSF Fator estimulador de colônias de macrófagos
MFF Max Facs Fix
MHC-I Complexo de histocompatibilidade principal de classe I
MHC-II Complexo de histocompatibilidade principal de classe II
OH Ovário-histerectomia
OMS Organização Mundial de Saúde
PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS Salina tamponada com fosfato
PE-Cy-5 Ficoeritrina conjugada com cianina
R-PE Ficoeritrina
RE Receptor de estrógeno
RP Receptor de progesterona
RRP Receptores de Reconhecimento de Padrões
SDA Solução de Diluição de Anticorpos
SRD Sem raça definida
SSC Side Scatter
T regs Células T regulatórias
TCR Receptor de Células T
TIL Linfócito intra tumoral
TNF Fator de necrose tumoral
TNM Tamanho tumoral, acometimento de linfonodo e metástase à distância
VD Ventrodorsal
UFBA Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 OBJETIVO GERAL	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. HIPÓTESES	9
4. REVISÃO DE LITERATURA	10
4.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS TUMORES MAMÁRIOS CANINOS	10
4.2 DIAGNÓSTICO	13
4.3 TRATAMENTO	15
4.4 IMUNOLOGIA TUMORAL NOS TUMORES DE MAMA	20
4.5 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA	31
5.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	31
5.3 AVALIAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA	32
5.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E AVALIAÇÃO PÓS- OPERATÓRIA	34
5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	35
5.6 IMUNOFENOTIPAGEM EM SANGUE PERIFÉRICO	38
5.7 QUIMIOTERAPIA COM CARBOPLATINA	41
5.8 ACOMPANHAMENTO E SOBREVIDA	42
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1 ACHADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	44
6.2 IMUNOFENOTIPAGEM DO SANGUE PERIFÉRICO	47
6.3 BIOMARCADORES	56
6.4 ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA	59
6.5 QUIMIOTERAPIA E COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIDA	61
7. CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXOS	86

Avaliação dos biomarcadores imunológicos (razão de células T CD4⁺ / CD8⁺ e expressão de MHC I por monócitos) em cadelas com carcinomas mamários.

RESUMO

Buscando uma melhor compreensão sobre o perfil dos leucócitos do sangue periférico e a suas correlações com o avanço do câncer de mama em cadelas, objetivou-se com a realização do presente estudo avaliar o potencial prognóstico/preditivo de biomarcadores imunofenotípicos (razão CD4⁺/CD8⁺ e expressão do IMF em monócitos), bem como, a eficácia da quimioterapia antineoplásica adjuvante a base de carboplatina, em cadelas portadoras de câncer de mama em estágio avançado ou com graduação histológica \geq II. Foram avaliadas 100 cadelas, sendo 10 cadelas híginas (grupo controle) e 90 cadelas portadoras de carcinomas mamários classificados histologicamente em dois grupos: (60) carcinomas em tumores mistos (MCT) e (30) outros carcinomas (MC). As pacientes foram submetidas a análise clínico-patológica, imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo, diagnóstico e graduação histopatológica do tumor, além da avaliação da taxa de sobrevivência trimestral por até 2 anos após a cirurgia. Cadelas com estadiamento \geq IV ou tumores com graduação histológica \geq II foram submetidas a quimioterapia com carboplatina. A idade das cadelas estudadas variou entre cinco e 18 anos. Animais sem raça definida foram mais frequentes (55,5%), seguidos pela raça poodle (23,3%). Estádio III, apresentação multicêntrica, acometimento bilateral e envolvimento das mamas abdominais e inguinais foram predominantes. A análise microscópica revelou resposta inflamatória associada ao tumor do tipo linfocitária multifocal moderada no grupo MCT e intensa no grupo MC, sendo os linfócitos a população predominante, seguida dos macrófagos. A imunofenotipagem revelou valores significativamente menores de linfócitos T e de suas subpopulações (TCD4⁺ e CD8⁺) nos grupos MCT e MC em relação ao controle. Percentuais de CD4⁺ e CD8⁺ foram significativamente menores em pacientes com tumores MCT grau II em comparação ao grau I. A razão CD4⁺/CD8⁺, os percentuais de linfócito B e CD14⁺ foram significativamente maiores nos grupos MCT e MC em relação ao controle. A intensidade média de fluorescência (IMF) do MHC I e II em monócitos foi significativamente maior no grupo MC em relação aos demais grupos. A avaliação das pacientes com base nos parâmetros propostos pelos biomarcadores razão CD4⁺/CD8⁺ e a expressão do IMF de

MHC I em monócitos possibilitou a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência ou morte, para os grupos MCT e MC, respectivamente. A análise da curva ROC com pontos de corte que definem razão $CD4^+/CD8^+$ atestam bons parâmetros probabilísticos, com sensibilidade de 100%, especificidade de 93,18% e acurácia de 97,8%, enquanto para MHC I sensibilidade de 100%, especificidade de 86,21% e acurácia de 99,8%. Pacientes tratados com quimioterapia, independente do grupo tiveram sobrevida global maior. Estes pacientes tratados quando segregados pelo grupo histológico e com base nos parâmetros dos biomarcadores revelaram melhores respostas nos pacientes com razão $CD4^+/CD8^+ \leq 1.8$ para grupo MCT e IMF de MHC I/ $CD14 \leq 100$ para grupo MC. A análise multivariada revelou poder prognóstico independente para o biomarcador IMF de MHC I/ $CD14$. Com base nos resultados conclui-se que a razão $CD4^+/CD8^+$ e a expressão de MHC I em monócitos possuem tanto potencial prognóstico quanto preditivo para cadelas portadoras de carcinomas mamários. Contudo, é necessária a aplicação desses biomarcadores em seus grupos específicos de carcinomas, considerando também a associação a outros fatores prognósticos clássicos. Cadelas portadoras de tumores MCT com graduação histológica \geq II devem ser submetidas ao tratamento quimioterápico adjuvante, mesmo na ausência de envolvimento nodal. A quimioterapia antineoplásica, a base de carboplatina, foi efetiva no alcance de maior sobrevida podendo ser indicada nos casos de tumores de mama, porém em alguns casos, não debelou a doença em curso.

Palavras-chave: Cadelas, sistema imune, quimioterapia, tumores mamários

Evaluation of immunological biomarkers (CD4 + / CD8 + T cell ratio and MHC I expression. by monocytes) in female dogs with mammary carcinomas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the prognostic / predictive potential of immunophenotypic biomarkers (CD4+/CD8+ ratio and expression of the MIF in monocytes) and to evaluate their correlation with the progression of mammary tumor in female dogs, as well as the efficacy of adjuvant antineoplastic chemotherapy based on carboplatin in female dogs with advanced or histological grade II mammary tumor. A total of 100 female dogs, 10 healthy female dogs (control group) and 90 female dogs with histologically classified mammary carcinomas were evaluated in two groups: (60) carcinomas in mixed tumors (MCT) and (30) other carcinomas (MC). Patients were submitted to clinical-pathological analysis, peripheral blood leukocyte immunophenotyping by flow cytometry, diagnosis and tumor histopathology, as well as evaluation of the quarterly survival rate for up to 2 years after surgery. Female dogs with staging = IV or tumors with histological grade = II were submitted to chemotherapy with carboplatin. The age of the female dogs studied ranged from 5 to 18 years. Non-breed animals were more frequent (55.5%), followed by the poodle breed (23.3%). Stage III, multicentric presentation, bilateral involvement and involvement of the abdominal and inguinal mammary glands were predominant. Microscopic analysis revealed an inflammatory response associated with a moderate multifocal lymphohistiocytic tumor in the MCT group and inter in the MC group, with lymphocytes being the predominant population, followed by macrophages. Immunophenotyping revealed significantly lower values of T lymphocytes and their subpopulations (T CD4+/and CD8+) in the MCT and MC groups in relation to the control. CD4+/and CD8+ ratios were significantly lower in patients with MCT grade II tumors compared to grade I. The CD4+/CD8+ ratio, the percentages of B and CD14 + lymphocytes were significantly higher in the MCT and MC groups in relation to the control. The mean fluorescence intensity (MIF) of MHC I and II in monocytes was significantly higher in the MC group compared to the other groups. The evaluation of the patients based on the parameters proposed by the biomarkers CD4+/CD8 + ratio and the expression of the MHC I MIF in monocytes allowed the segregation of female dogs with a high probability of survival or death, for the MCT and MC groups, respectively. The analysis of the ROC curve with cut-off points that define CD4+// CD8 + ratio attests good probabilistic parameters, with a sensitivity of 100%, specificity of 93.18% and accuracy of 97.8%, while for MHC I sensitivity of 100%, specificity Of 86.21% and accuracy of 99.8%. Patients treated with chemotherapy, independent of the group had greater overall survival. These patients treated when segregated by the histological group and based on the biomarkers parameters revealed better responses in patients with ratio = 1.8 for MCT and IHC group of MHC I / CD14 = 100 for MC group. Multivariate analysis revealed independent prognostic power for the MHC I / CD14 biomarker. Based on the results, it is concluded that the CD4+/CD8+ ratio and the MHC I expression. in monocytes have both prognostic and predictive potential for female dogs carrying mammary carcinomas. However, the application of these biomarkers in their specific groups of carcinomas is necessary, considering also the association with other classic prognostic factors. MCT tumors with histological grade = II should undergo adjuvant chemotherapy, even in the absence of nodal involvement. The antineoplastic

chemotherapy, based on carboplatin, was effective in achieving greater survival and could be indicated in cases of mammary tumors, but in some cases, it did not stop the ongoing disease.

Key words: Female dogs, immune system, chemotherapy, mammary tumors

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as neoplasias mais comuns nas cadelas, frequentemente apresentam comportamento biológico agressivo e suas metástases resultam no óbito do paciente. Esta condição aponta a necessidade de melhores indicações prognósticas e terapêuticas na rotina da oncologia veterinária (SORENMO, 2003; ESTRELA-LIMA et al., 2010; CAMPOS, 2010; KIM et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2013; CARVALHO et al., 2014; CASSALI et al., 2014).

Em cães, assim como nos humanos, o envolvimento do sistema imunológico tem um papel crucial no desenvolvimento de neoplasias, todavia, a participação dos leucócitos presentes no sangue periférico e em infiltrados tumorais, na promoção e desenvolvimento do câncer ainda é motivo de muita controvérsia, pois envolve a participação de mecanismos extremamente complexos e ainda pouco elucidados (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

É crescente a busca dos pesquisadores por novos marcadores tumorais no sangue periférico, que auxiliem no prognóstico e na terapia a ser instituída para pacientes de câncer de mama da mulher (SOUZA, 2002; ALMEIDA et al., 2005; WU et al., 2010). Contudo, em Medicina Veterinária, os estudos dos marcadores tumorais em sangue periférico são ainda incipientes (CAMPOS, 2010; ESTRELA-LIMA et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2013) mas, futuramente, representarão importantes avanços na avaliação prognóstica e preditiva no paciente canino.

Alguns estudos têm sugerido que a identificação das subpopulações de células T CD4⁺, CD8⁺ e células T reguladoras, bem como, das citocinas, fornecem um método sensível e importante para avaliar a imunidade celular em pacientes com câncer (CAMPBELL et al., 2005; MACCHETTI et al., 2006; WHITESIDE, 2008; MATKOWSKI et al., 2009). Em um estudo para determinação do perfil de leucócitos no sangue periférico de cadelas com carcinomas mamários, Estrela-Lima e colaboradores (2012) observaram que os linfócitos T CD4⁺ estão associados à progressão tumoral, enquanto os linfócitos T CD8⁺ inibem o desenvolvimento tumoral. A partir desta análise, os autores propuseram a utilização de dois parâmetros como biomarcadores, a razão CD4⁺/CD8⁺ e a Intensidade Média de Fluorescência do MHC I em monócitos, os quais apresentaram significativo

valor clínico e prognóstico, possibilitando a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência ou morte, respectivamente. Estudos com essa temática podem auxiliar a melhor compreensão sobre a heterogeneidade imunológica dos carcinomas mamários caninos, fornecendo ferramentas alternativas no estabelecimento de possíveis protocolos terapêuticos baseados no perfil imunofenotípico desses tumores.

Pacientes com estadiamento clínico avançado podem se beneficiar, em variados graus, de terapia complementar (LAVALLE et al., 2012). A quimioterapia antineoplásica é o tratamento adjuvante mais utilizado nas cadelas com câncer de mama, contudo, tem eficácia ainda discutida (TRAN et al., 2014; ARENAS et al., 2016). Portanto, a descoberta e utilização de biomarcadores com potencial preditivo, para grupos específicos e relacionado a utilização da quimioterapia, pode representar uma ferramenta consensual e trazer um substancial avanço na terapêutica da doença.

Desta forma, conhecer o complexo perfil imunológico associado aos aspectos clínicos do câncer de mama é o primeiro passo para identificação de biomarcadores aplicáveis na monitoração da progressão da doença, bem como, propor estratégias imunoterapêuticas antineoplásicas eficazes. Neste contexto, objetivou-se com a realização do presente estudo avaliar o potencial prognóstico e preditivo dos biomarcadores imunofenotípicos razão $CD4^+/CD8^+$ e a Intensidade Média de Fluorescência do MHC I em monócitos, bem como a eficácia da quimioterapia antineoplásica adjuvante a base de carboplatina, em cadelas portadoras de câncer de mama em estadio avançado ou com graduação histológica \geq II.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial dos biomarcadores imunológicos (razão de células T CD4⁺/CD8⁺ e a expressão de MHC I em monócitos) em prever quais pacientes possuem maior risco de morte pela doença (indicador prognóstico) e ainda quais podem potencialmente se beneficiar com o tratamento (preditivo); bem como verificar se o tratamento quimioterápico com carboplatina é eficaz e resulta em maior taxa de sobrevivência em cadelas com metástase regional ou tumor com graduação histológica \geq II.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a imunofenotipagem dos leucócitos no sangue periférico de cadelas portadoras de carcinoma mamário e comparar entre os Grupos MCT e MC os percentuais de linfócitos T, TCD4⁺, TCD8⁺, razão CD4⁺/CD8⁺, linfócitos B e expressão de MHC I em células CD14⁺ correlacionando os resultados observados a maior agressividade da doença;
- Utilizar parâmetros fenotípicos para confirmar o potencial prognóstico e preditivo dos biomarcadores imunológicos propostos, bem como identificar possíveis correlações destes com a sobrevivência e fatores prognósticos clássicos como tamanho do tumor, graduação histológica e estadiamento clínico;
- Identificar possíveis alterações nos percentuais dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto, (Grau I e Grau II) e sua relação com a maior agressividade tumoral;
- Verificar, nos animais segregados com base nos parâmetros propostos pelos biomarcadores, a eficácia da quimioterapia antineoplásica com carboplatina, no

protocolo já estabelecido, em promover maior taxa de sobrevida em cadelas portadoras de carcinoma mamário;

- Determinar em cadelas tratadas com carboplatina que evoluíram para o óbito, a partir da realização do exame necroscópico, a causa mortis, possível relação com efeitos colaterais do tratamento e presença de focos metastáticos.

3. HIPÓTESES

- A razão $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ e a intensidade média de fluorescência (IMF) de MHC I em $CD14^+ \leq 100$ são biomarcadores imunológicos com poder prognóstico, mas não preditivo, aplicáveis na rotina oncológica, para cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto e outros carcinomas, respectivamente;
- Cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto com graduação histológica $\geq II$ devem ter indicação para realização de quimioterapia, independente do status do linfonodo regional, diante do seu potencial de malignidade e baixo percentual de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$;
- O protocolo quimioterápico a base de carboplatina endovenosa, na dosagem de 300 mg/m^2 , com tempo de infusão de cinco minutos, ciclo total de seis sessões com intervalos de 21 dias é totalmente eficaz no combate a neoplasia mamaria e seus efeitos colaterais não representam nenhum tipo de ameaça a vida da paciente.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

As neoplasias mamárias são os tumores mais frequentes nas fêmeas, principalmente em mulheres, cadelas e gatas, sendo consideradas raras em outras espécies (BOSTOCK, 1986; PELETEIRO, 1994; CASSALI, 2000; HENDERSON; FEIGELSON, 2000; INGVARSON, 2001; MISDORP, 2002 GOLDSCHMIDT *et al.*, 2017). Estes tumores na cadela são de duas a três vezes mais frequentes do que o observado na mulher (MEULTEN, 2017). Desta forma, diante da alta frequência e principalmente das muitas similaridades epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas entre as neoplasias mamárias em humanos e caninos, justifica a utilização da cadela como modelo de estudo comparativo entre as duas espécies (CASSALI, 2000; MARTINS; FERREIRA, 2003; UVA *et al.*, 2009, ESTRELA-LIMA 2010; RIVERA e VON EULER, 2011).

No Brasil, estes tumores representam mais da metade de todas as neoplasias que acometem esta espécie, em sua maioria com caráter maligno (OLIVEIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2010; FELICIANO *et al.*, 2012). Esta alta frequência pode ser reflexo do diagnóstico tardio, que reduz a taxa de sobrevivência e dificulta a obtenção de melhores resultados terapêuticos (TORÍBIO *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; CASSALI *et al.*, 2014).

A alta taxa de acometimento nas cadelas em Salvador, Bahia, Brasil, tem sido atestada por vários pesquisadores (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; TORÍBIO *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2012; VIEIRA-FILHO, 2015, MACHADO, 2015; PEREIRA, 2016, CONCEIÇÃO, 2017). Toríbio e colaboradores (2012), demonstraram correlação entre a falta de recurso econômico, o desconhecimento a respeito da importância da doença e as características clínicas dos pacientes e macroscópicas do tumor na população estudada. Estrela-Lima e colaboradores (2010) observaram que dos 51 tumores mamários estudados 65% eram maiores que cinco centímetros, ulcerados, malignos, grande parte destes com metástase para linfonodo regional e sobrevivência global menor que seis meses.

De maneira similar à espécie humana, as neoplasias mamárias em caninos ocorrem quase que exclusivamente em fêmeas, sendo raras em machos, acometendo

menos de 1% desses animais (MIALOT, 1988; MEULTEN, 2017). Em geral, o risco de desenvolvimento de câncer de mama aumenta significativamente com a idade, sendo mais frequente nas cadelas entre nove e onze anos (BENJAMIM *et al.*, 1999; MISDORP, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; LANA *et al.*, 2007; PIEKARZ, 2009; SORENMO *et al.* 2011 CASSALI *et al.*, 2014). Alguns autores indicam maior acometimento de raças de pequeno porte e predisposição genética das raças Maltes, Yorkshire Terrier, Shih Tzu e Poodle para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (SCHAFER, *et al.*, 1998; IM *et al.*, 2013).

Estudos realizados no Brasil indicam maior frequência de tumores mamários em Poodles e cães sem raça definida (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; FURIAN *et al.*, 2007; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; TORÍBIO *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2012; LAVALLE *et al.*, 2012; VIEIRA-FILHO, 2015; MACHADO, 2015; PEREIRA, 2016; CONCEIÇÃO, 2017). Enquanto, Queiroga e Lopes (2002), em Portugal, verificaram que animais das raças Boxer e Beagle apresentaram menor risco de desenvolverem tumores da glândula mamária. Contudo, segundo Peleteiro (1994) e Cassali e colaboradores (2014) ainda não existem subsídios que possibilitem inferir sobre predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na cadela.

Os tumores de mama são classificados como neoplasias hormônio dependentes de etiologia multifatorial (GOLDCHMIDT *et al.*, 2017). Componentes genéticos, nutricionais, ambientais e, principalmente, hormonais representam importantes fatores nos processos de iniciação e desenvolvimento deste tipo tumoral (SILVA *et al.*, 2004). O estrógeno e a progesterona desempenham um papel importante no desenvolvimento da glândula mamária normal, além de atuarem no desenvolvimento de tumores mamários em cadelas e gatas. Sabe-se que os hormônios esteróides atuam estimulando a proliferação celular e predispõem às alterações genéticas que darão origem à célula neoplásica (SILVA *et al.*, 2004; THURÓCZY *et al.*, 2007; BOCARDO *et al.*, 2008).

Cadelas intactas e castradas podem ser acometidas por neoplasias mamárias, contudo a frequência aparentemente é maior em cadelas não castradas (GOLDCHMIDT *et al.*, 2017). Estudo de Schneider e colaboradores (1969) indicou efeito protetor da ovariário-histerectomia (OH), desde que realizada precocemente. Nos casos em que a castração foi realizada antes do primeiro ciclo estral, a ocorrência aconteceu em somente 0,5% dos animais estudados. Quando a OH foi realizada após o primeiro e segundo estro,

as taxas de acometimento subiram para oito e 27%, respectivamente. Entretanto, Cassali e colaboradores (2014) indicam a realização da OH após o primeiro estro, para que haja um completo desenvolvimento musculoesquelético, imunológico e endócrino, reduzindo as possibilidades de problemas decorrentes da privação dos hormônios ovarianos. A castração precoce retarda o fechamento da placa epifisária dos ossos longos, predispõe a dermatite de prega vulvar e principalmente obesidade (SALMERI *et al.*, 1991; ROOT *et al.*, 1997; ZACHARY; McGAVIN, 2012). Estudos já demonstraram que camundongos com deficiência de estrogênio apresentam perda do volume e espessura do osso trabecular, osteopenia, alterações na cartilagem articular, aumento de gordura intra-abdominal, diminuição de massa magra e alterações no perfil lipídico (FISHER, GRAVES, PARLOW, 1998; JONES *et al.*, 2000; SIMPSON, CLYNE, RUBIN, 2002;). Deste modo, é possível que a castração precoce em cadelas previna tumores mamários, mas em contrapartida predisponha a significativas alterações metabólicas e de desenvolvimento.

A ausência do efeito protetor quando a OH é realizada após o terceiro estro é considerada por alguns pesquisadores (SCHNEIDER *et al.*, 1969; MORRIS *et al.*, 1998). Apesar disso, Sorenmo e colaboradores (2000) relataram maior sobrevida em cadelas que realizaram a OH concomitante a cirurgia ou até dois anos antes. Uma grande revisão de trabalhos publicados, feita por Beauvais e colaboradores (2012) sobre os efeitos da OH como método preventivo para o câncer de mama em cadelas, aponta diversos problemas metodológicos na totalidade das publicações e indica a necessidade de estudos adicionais acerca do melhor momento para castração e sua real efetividade como fator protetor contra a carcinogênese mamária.

O uso de progestágenos para o controle do estro, a pseudociese, a obesidade e dietas ricas em gorduras, bem como, a avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação tem sido citados como fatores de risco associados ao câncer de mama (PELETEIRO, 1994; PEÑA *et al.*, 1998; PÉREZ-ALENZA *et al.*, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; CLEARY *et al.*, 2010; YEON *et al.*, 2011). A utilização de hormônios exógenos, progesterona ou estrógeno, aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas. Mesmo em baixas doses, a progesterona exógena pode induzir neoplasias benignas. Enquanto a combinação destes dois hormônios pode induzir o desenvolvimento de tumores malignos (MISDORP, 1999).

Os fatores nutricionais têm sido objetos de estudos em tumores da glândula mamária em cadela, por possivelmente atuarem como agentes desencadeantes desse tipo de neoplasia (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Sabe-se que a obesidade em humanos está diretamente relacionada com a concentração e disponibilidade de hormônios sexuais femininos (WILLETT, 2000). Estudos epidemiológicos demonstraram que dietas ricas em gordura e uma condição corporal obesa podem aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasia mamária em cadelas, principalmente na fase juvenil (PÉREZ-ALENZA *et al.*, 1998; CLEARY *et al.*, 2010).

Com relação aos fatores ambientais, foi demonstrado por Andrade e colaboradores (2010) a presença de concentrações significativas de inseticidas piretróides no tecido adiposo adjacente aos tumores mamários de cadelas, principalmente, nos tumores mais agressivos, sugerindo o possível envolvimento de contaminantes ambientais na carcinogênese mamária. Nesse estudo, a partir da cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi possível detectar e identificar contaminantes ambientais no tecido adiposo adjacente ao tumor, destacando-se a aletrina, a cialotrina, a cipermetrina, a deltametrina e a tetrametrina

4.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das neoplasias mamárias se inicia na anamnese, quando relatado o histórico clínico e possíveis alterações reprodutivas, como pseudociese e cios irregulares. O exame clínico deve ser completo, abrangendo a avaliação do sistema linfático e tegumentar, como também sinais sistêmicos que possam estar relacionados a presença de metástases, como dispneia, icterícia, volumes palpáveis anormais, lesões ulcerativas, alterações neurológicas ou oculares (FOSSUM, 2005).

Diferentes apresentações clínicas de neoplasias mamárias podem ser observadas no momento do diagnóstico, as quais podem incluir um estágio inicial, localmente invasivo até o tumor mamário metastático (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010). De forma geral, as neoplasias mamárias se apresentam, principalmente, em forma de nódulos, na maioria das vezes, detectável ao exame clínico (MISDORP, 1999; FOSSUM, 2005; LANA, 2007). A apresentação desses nódulos pode ser circunscrita ou multicêntrica, de

consistência, mobilidade e dimensões variáveis, podendo estar relacionados a ulcerações e inflamação local.

É comum a presença de mais de um tumor em uma mesma mama (tumores múltiplos) ou envolvendo simultaneamente várias mamas (tumores multicêntricos). Estes tumores podem representar diferentes tipos histológicos e o tumor de pior prognóstico determinará a evolução clínica do paciente (MISDORP, 2002; SORENMO *et al.*, 2011; CASSALI *et al.*, 2014). As glândulas inguinais e abdominais caudais são os sítios mais frequentes de desenvolvimento tumoral, possivelmente por apresentarem uma maior quantidade de parênquima mamário e maior resposta proliferativa à ação de hormônios (MISDORP, 2002; SANTOS *et al.*, 2010; EZERSKYTE *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011).

O exame citopatológico pode ser utilizado no processo de triagem do paciente, podendo indicar a partir de material colhido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), comprometimento linfonodal e possíveis diagnósticos diferenciais, tais como mastites, cistos, abscessos ou outros tipos de tumores cutâneos (ZUCCARI *et al.*, 2001; CASSALI *et al.*, 2014).

Os exames de diagnóstico por imagem são extremamente necessários pois possibilitam evidências de metástases à distância e correspondem a radiografias (torácica e ultrassonografia abdominal (FELICIANO *et al.*, 2012). Para as radiografias torácicas são recomendadas a realização de três projeções (laterais direita e esquerda e ventrodorsal), que podem revelar a evidência de metástase aos pulmões, pleura e linfonodos intratorácicos (RODASKI; PIEKARZ, 2009). Estudos revelam que nódulos metastáticos pulmonares menores de 0,5 mm podem não ser observados no exame radiográfico e, portanto, nestes casos, a tomografia computadorizada apresenta maior acurácia na detecção de metástases pulmonares (OTONI *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2012).

O tamanho da lesão primária (T), o comprometimento para os linfonodos regionais (N) e a presença ou não de metástase a distância (M) são informações utilizadas para realizar o estadiamento clínico do paciente. O sistema TNM foi estabelecido pela organização mundial da saúde (OMS) e, modificado por OWEN (1980) no intuito de promover indicação prognóstica, agrupar animais em fases distintas de evolução da

doença e possibilitar o compartilhamento de dados entre profissionais e centros de pesquisa (CASSALI *et al.*, 2014).

O diagnóstico definitivo é obtido a partir do exame histopatológico, que indica a natureza, tipo histológico e infiltração tumoral (CASSALI, 2000; MISDORP, 2002). Atualmente, a classificação histopatológica mais utilizada para as neoplasias mamárias é a proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) modificada por Misdorp e colaboradores (1999) complementada pelo Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors (CASSALI *et al.*, 2014).

A classificação e a graduação histopatológica dos tumores mamários são de suma importância por predizerem o comportamento biológico e o potencial de malignidade da neoplasia, respectivamente (BOSTOCK, 1986; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; PEÑA *et al.*, 2012; CASSALI *et al.*, 2014). Dentre os tumores malignos mais frequentes, observam-se os carcinomas, e dentre estes, o Carcinoma em Tumor Misto Benigno (CMT) é o subtipo mais comumente observado (CASSALI, 2000; MARTINS *et al.*, 2002; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; DAMASCENO *et al.*, 2012; DAMASCENO *et al.*, 2016a 2016b; VIEIRA-FILHO, 2015; CARNEIRO, 2015). Alguns tipos de carcinomas, classificados como especiais tem sido relatados na medicina veterinária, a exemplo do carcinoma anaplásico, carcinoma de célula escamosa, carcinoma mucinoso, carcinoma rico em lipídeos, carcinoma lobular pleomórfico e carcinoma micropapilar (CASSALI *et al.*, 1999; CASSALI *et al.*, 2002; GAMA *et al.*, 2008; D'ASSIS *et al.*, 2016; FRANZONI *et al.*, 2017).

4.3 TRATAMENTO

O procedimento cirúrgico é considerado o tratamento de eleição para os tumores mamários caninos, e que confere maior taxa de sobrevivência, incluindo a cura desde que seja realizado precocemente (HEDLUND, 2008; CASSALI *et al.*, 2014). Contudo, nos casos de carcinoma inflamatório mamário, neoplasia altamente invasiva, este procedimento não é indicado em consequência do elevado risco de disseminação tumoral e desenvolvimento de CID (coagulação intravascular disseminada), que cursa com hemorragias profundas

durante o procedimento cirúrgico (CASTELLANO; IDIART, 1994; RODASKI; PIEKARZ, 2009).

Existem inúmeras técnicas cirúrgicas descritas na literatura para as cadelas, como mastectomia simples, mastectomia regional, mastectomia unilateral e mastectomia bilateral (LANA *et al.*, 2007; RODASKI; PIEKARZ, 2009). Todavia, o tipo de cirurgia está ligado diretamente ao estado geral do paciente, tamanho tumoral, localização, drenagem linfática e estadiamento clínico (HEDLUND, 2008). Tran e colaboradores (2014) afirmam que excisões grandes com margens completas podem possibilitar maior sobrevida global dos pacientes, mesmo quando há invasão linfática.

Terapias complementares à cirurgia têm sido utilizadas nas cadelas com câncer de mama, como a quimioterapia tradicional (LAVALLE *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2014; ARENAS *et al.*, 2016), quimioterapia metronômica (LONDON *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2016), inibidores da tirosina-kinase, desmopressina (HERMO *et al.*, 2011) e terapia com anti-inflamatórios inibidores da enzima COX-2 (LAVALLE *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2014; ARENAS *et al.*, 2016).

A quimioterapia antineoplásica é a modalidade de tratamento neoadjuvante ou adjuvante à cirurgia, indicada nos casos em que existe metástase a distância, invasão linfática ou sanguínea e em tipos tumorais mais agressivos, que estão relacionados a um pior prognóstico (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011; SLEECKX *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2013; CASSALI *et al.*, 2014). Os protocolos propostos na literatura consistem na utilização de várias substâncias antineoplásicas, de forma individual ou combinada, como doxorrubicina, ciclofosfamida, 5-fluoracil, gencitabina, docetaxel, mitoxantrona, cisplatina e carboplatina (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2001; SIMON *et al.*, 2006; MARCONATO *et al.*, 2008; LAVALLE *et al.*, 2012; CASSALI *et al.*, 2014; TRAN *et al.* 2015; ARENAS *et al.*, 2016).

A cisplatina é um derivado de platina que provoca nefrotoxicidade potencialmente irreversível, além de ser dose-cumulativa (NEVES; VARGAS, 2011). Em contrapartida, a carboplatina, derivado de segunda geração da platina, é menos nefrotóxica que a cisplatina, não sendo necessário induzir a diurese salina (RODASKI; DE NARDI, 2008). Sua estrutura difere da cisplatina pela presença de ligantes do tipo carboxilato no lugar dos ligantes abandonadores cloreto, conferindo maior solubilidade em água, comparado à cisplatina (WHEATE *et al.*, 2010). A carboplatina também é

menos reativa, ligando-se em menor extensão às proteínas do plasma, além de ser mais facilmente excretada pela urina (NEVES; VARGAS, 2011). Todos estes fatores reduzem a toxicidade da carboplatina, o que aumenta a dose da droga tolerada pelo organismo (RODASKI; DE NARDI, 2008).

O mecanismo de ação da carboplatina envolve a inativação das fitas de DNA no núcleo celular, principalmente na fase S da divisão celular (RODASKI; DE NARDI; 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005). Em pesquisas *in vitro*, os agentes platinados mostraram maior atividade antitumoral do que a doxorrubicina, o que justifica os estudos com a sua utilização na terapia para pequenos animais (SIMON *et al.*, 2001). Em estudo prospectivo randomizado, Lavalle e colaboradores (2012) atestaram benefício do tratamento complementar à cirurgia em cadelas, com a utilização da carboplatina na dose de 300 mg/m², em três sessões com intervalos de 21 dias como agente antineoplásico único. Com este protocolo terapêutico, os autores observaram maior sobrevida global nas cadelas portadoras de neoplasia mamária, quando comparadas com animais tratados apenas com cirurgia.

Dentre os efeitos colaterais mais comumente observados da carboplatina estão as alterações renais, sendo necessária avaliação da função renal antes e durante o tratamento, além de efeitos gastrointestinais como anorexia, êmese e constipação, também podendo ocorrer as alterações hepáticas (RODASKI; DE NARDI, 2008). Entretanto, o principal efeito colateral da carboplatina é hematológico, que se manifesta principalmente por leucopenia, podendo também ocorrer anemia (LANA *et al.*, 2007). A mielossupressão é observada entre 10 e 14 dias, período denominado “nadir da droga”, e pode ser severa (GOTTESMAN, 2002). O nadir do quimioterápico corresponde ao tempo transcorrido entre a aplicação da droga e a ocorrência do menor valor de contagem hematológica (RODASKI; DE NARDI, 2008).

A observação de que grandes percentuais dos tumores mamários das cadelas expressam a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) tem sido importante para justificar a utilização de anti-inflamatórios não esteroides na terapia complementar dos pacientes (LAVALLE *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2014; ARENAS *et al.*, 2016). Lavalle e colaboradores (2009) identificaram, em 96,6% dos animais por eles pesquisados, a presença da COX-2 em variadas concentrações e observaram aumento na sobrevida global com este tratamento complementar à cirurgia, associado ou não a quimioterapia

antineoplásica com carboplatina. Arenas e colaboradores (2016) identificaram positividade para COX-2 em todos os animais da sua pesquisa, sugerindo aumento de sobrevida global e de tempo livre da doença com a utilização de inibidores da COX-2 como tratamento adjuvante à cirurgia.

É crescente o número de estudos que buscam novas abordagens terapêuticas adjuvantes em cadelas portadoras de carcinoma mamário, a exemplo da naltrexona. A naltrexona em doses baixas possui a capacidade de reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia, estimular o sistema imunológico e promover o bem-estar, podendo ser utilizado como tratamento isolado ou combinado a cirurgia e quimioterapia (DONAHUE *et al.*, 2011).

A naltrexona em baixas doses (0,05 mg diariamente) antes de dormir, atua na hipófise e na supra-renal, ocupando de forma reversível os receptores opioides endógenos (μ , κ e δ) por 3 a 4 horas (LEE; FUJIOKA, 2009). Após este período a naltrexona se desliga destes receptores, fazendo com que o organismo aumente em duas a três vezes a produção de peptídeos opioides endógenos (beta-endorfina e meta-encefalina, na hipófise e supra-renal, respectivamente) como resposta tipo “feedback” positivo, as quais saturam estes receptores quando a naltrexona deixa de ocupá-los (ZAGON; MCLAUGHLIN, 2005). Em um estudo realizado com cadelas submetidas à quimioterapia, a naltrexona em doses baixas representou uma alternativa viável de tratamento adjuvante, pois aumentou as concentrações de beta-endorfina e meta-encefalina e estimulou a resposta dos linfócitos CD8⁺, proporcionando manutenção da qualidade de vida e contribuindo para o aumento na taxa de sobrevida destes pacientes (CARNEIRO, 2015).

Neste sentido, associada à terapia adjuvante e neoadjuvante, a medicina complementar e alternativa tem ganhado destaque por ser utilizada nos tratamentos de câncer de mama em mulheres, principalmente a acupuntura e a eletroacupuntura, no controle e alívio da dor oncológica e pós-operatória. A eletroacupuntura consiste em técnica complementar a acupuntura, em que é realizada a passagem de corrente elétrica através das agulhas (SCOGNAMILLO-SZABÓ; BECHARA, 2010). O efeito analgésico produzido pela eletroacupuntura é influenciado pelos pontos de acupuntura estimulados, frequência elétrica (Hz/s), intensidade da descarga, além da liberação de opioides

endógenos, a exemplo das endorfinas, encefalinas e dinorfinas (TAFFAREL; FREITAS, 2009; GAKIYA *et al.*, 2011; CASSU *et al.*, 2012).

A eletroacupuntura tem se mostrado uma terapia capaz de promover analgesia pós-operatória compatível com aquela obtida com a utilização de opioides (CASSU *et al.*, 2008), com a vantagem de ser um método prático, com mínimos efeitos indesejáveis e de custo acessível (ESPER, 2005; CASSU *et al.*, 2008; SANTOS, 2014). Em um estudo com cadelas submetidas a mastectomia e ovariectomia, foi avaliado o efeito analgésico trans e pós-operatórios da eletroacupuntura em onda denso-dispersa na frequência de 20 Hz e observou-se que este efeito foi capaz de promover ação antinociceptiva superior ao obtido com a morfina (PEREIRA, 2016).

Segundo Novosad (2003), a radioterapia e a hormonioterapia são considerados métodos alternativos para o tratamento dos tumores mamários, sendo ainda pouco utilizados na medicina veterinária em virtude da escassez de estudos realizados em cães. A dificuldade em se obter sucesso na radioterapia em animais está relacionada com o custo, programas de tratamento e indisponibilidade de técnicos e aparelhos especializados, no entanto apresenta resultados satisfatórios para qualidade de vida do paciente e estética (RODASKI; PIEKARZ, 2009; MORETTO; CORRÊA, 2013).

No que concerne à hormonioterapia, este tratamento está indicado em tumores que exibam positividade para receptores de estrógeno, progesterona ou prolactina. Na medicina, a terapia hormonal é considerada o tratamento de rotina, notadamente pela utilização do citrato de tamoxifeno, que atua como um inibidor seletivo dos receptores de estrógeno na glândula mamária (JORDAN, 2006). Contudo, devido ao elevado risco de desenvolvimento de incontinência urinária e piometra em cadelas, a administração do tamoxifeno é indicado apenas para cadelas esterilizadas (TAVARES *et al.*, 2010).

Outrossim, terapêuticas específicas para o bloqueio das atividades de receptores hormonais como o receptor de crescimento epidérmico (HER2) e a concentração de receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), que são receptores dos fatores de crescimento epidérmico, tem sido amplamente estudada em neoplasias mamárias humanas, a exemplo do trastuzumabe, imatinibe, bevacizumabe, cetuximabe, gefitinibe e erlotinibe (LEITE *et al.*, 2012). As mutações nestes proto-oncogenes estão entre as principais alterações genéticas relacionadas com o desenvolvimento do câncer em seres humanos (YAZIJI *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2005). Contudo, alterações de HER2

e EGFR já foram detectadas nos tumores mamários da cadela, mas o seu papel na gênese e progressão dos tumores mistos é desconhecido (GERALDES *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2004; BERTAGNOLLI *et al.*, 2011; DAMASCENO *et al.*, 2016a).

Na literatura há menção do uso da imunoterapia como tratamento adjuvante em neoplasias mamárias, com aumento do tempo de sobrevida e regressão de metástases pulmonares (LANA *et al.*, 2007). Em um estudo observou-se que a administração de BCG (Bacilo Calmette-Guérin) em cadelas com tumores mamários, em intervalos de uma, duas e quatro semanas e então a cada oito semanas, até completar um ano pós-cirúrgico, foi associada a um aumento de sobrevida (NUNES *et al.*, 2011).

Por conseguinte, dada a complexidade no desenvolvimento do processo tumoral mamário, as modalidades terapêuticas têm sido cada vez mais alvo de constante atualização, com tendências para preconização de tratamentos combinados e personalizados (KARAYANNOPOULOU; LAFIONIATIS, 2016).

4.4 IMUNOLOGIA TUMORAL NOS TUMORES DE MAMA

O sistema de defesa dos mamíferos apresenta dois tipos de resposta imune, a inata e a adaptativa, que tem papel essencial na sobrevivência das espécies. A imunidade inata é constituída pelas barreiras físicas e químicas, células NK, células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, sistema complemento, além de proteínas mediadoras da inflamação e citocinas. Os componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B, representando a resposta imune celular e humoral, respectivamente (HARRIS; DRAKE, 2013; VARN *et al.*, 2016), formando barreiras de defesa contra substâncias estranhas e células alteradas, antes que formações neoplásicas avancem (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

O câncer é caracterizado por um processo progressivo de células transformadas e a defesa eficaz requer a destruição de células malignas. Para isso, é necessário o sistema imunológico distinguir entre as células tumorais e as células normais (VISSER *et al.*, 2006). Porém, muitos tumores continuam a progredir, o que demonstra uma falha da função de proteção do sistema imune (VISSER *et al.*, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011), sendo a evolução tumoral composta pela fase “in situ”, crescimento, invasão,

extravasamento e metástase, quando as células tumorais interagem com o microambiente, sofrendo influência de sinais, que podem contribuir com o processo inflamatório e para a resposta imune anti-tumoral (YAQUB; AANDAH, 2009).

Há mais de um século, foi proposto por Ehrlich (1909) o conceito de “vigilância imunológica” no combate ao câncer, indicando células que mantinham os tumores controlados. Ao longo do tempo, Thomas (1959) e Burnet (1970) acrescentaram a essa proposta inicial, a informação de que o sistema imune faz o reconhecimento de células anormais e promove a sua eliminação como forma de proteção. Todo esse antigo conceito se sustenta pela evidência de que a replicação celular gera células defeituosas, malignas ou potencialmente malignas, ao longo da existência dos organismos e que o sistema imune é o responsável pelo controle dessas alterações, promovendo mecanismos de eliminação dessas células (MELVOLD; STICCA, 2007).

As respostas inflamatórias influenciam em diferentes estágios do desenvolvimento tumoral (FINN, 2008; MORRISON, 2012). O aumento da produção de citocinas, quimiocinas, expressão de oncogenes, ciclooxigenase 2, dentre outros mediadores pró-inflamatórios, potencializam a proliferação de células tumorais, além de características deletérias como invasão, angiogênese, metástases, quimioresistência e radioresistência (AGGARWAL *et al.*, 2006; BARKWILL; MANTOVANI, 2010; SETHI *et al.*, 2012). Sugere-se que a inflamação crônica seja muito importante por potencializar o desenvolvimento do câncer (VASSELE *et al.*, 2011; MORRISON, 2011).

A primeira linha do mecanismo de defesa é a imunidade inata, entretanto não apresenta memória e é inespecífica ao antígeno (SNYDER, 2009). A principal via efetora dessa resposta é através das células NK, que liberam perforinas, que formam poros nas membranas celulares e permitem a penetração das granzimas, que induzem a apoptose (ABBAS; LICHTMAN, 2012). A ação das células NK sofre regulação de sinais inibitórios e estimulantes, sendo importantes quando há queda da expressão MHC classe I nas células tumorais, não permitindo a evasão das mesmas dos linfócitos T citotóxicos (MORETTA *et al.*, 2002). Estudos de Green e colaboradores (2013) e de Santos e colaboradores (2014), observaram que pacientes humanos com metástases apresentavam menos células NK em sangue periférico, se comparados com pacientes que não apresentavam metástases, sendo que os motivos ainda não são claros.

A resposta adaptativa humoral provém da ativação dos linfócitos B que pode gerar a produção de anticorpos específicos para o combate de antígenos tumorais, através da ligação dos mesmos, realizando o combate a vários antígenos que amplia significativamente a vigilância imunológica do organismo hospedeiro (MELVOLD; STICCA, 2007; SPANER; BARROLO, 2011). Os linfócitos B reconhecem antígenos extracelulares e se diferenciam em células secretoras de anticorpos, funcionando como mediadores da imunidade humoral (ABBAS; LICHTMAN; 2005).

O papel dos linfócitos T é também um paradoxo que cerca a resposta adaptativa celular. Apesar da evidencia de que eles podem destruir células tumorais *in situ*, essas respostas parecem frequentemente ineficazes na destruição do câncer estabelecido (MACCHETI *et al*, 2006; CURIGLIANO, 2011). Barreiras que impossibilitam o reconhecimento dos tumores por células imunes, como o sequestro de antígenos associados aos tumores, a diminuição de moléculas de histocompatibilidade (MHC) ou a perda de co-estimulação de moléculas requeridas por células T citotóxicas, geram o que se chama “disfunção imune”, que impossibilita o combate e eliminação do tumor (MACCHETI *et al*, 2006; SHEU *et al.*, 2008).

A eliminação das células neoplásicas pelas células T CD8⁺, se sustenta pela apresentação de forma eficiente dos peptídeos, que são derivados de antígenos tumorais pelas moléculas de MHC I (SCHAROVSKY *et al.*, 2006). Após o reconhecimento dos peptídeos tumorais associados ao MHC I, o linfócito T CD8 são ativadas e capazes de eliminar células tumorais por apoptose, utilizando os mecanismos de liberação de perforinas, granzimas, FAS ligante e citocinas (NARENDRA, 2013; POGGI *et al.*, 2014).

Em relação a disfunção imune que parece estar presente no paciente com câncer, as respostas envolvendo as células T citotóxicas (CD8⁺), Células T helper 1 (Th1) e células *natural killer* (NK), parecem proteger contra a progressão tumoral. Por outro lado, respostas imunes envolvendo células B e ativação de imunidade humoral crônica, polarizada em células T helper 2 (Th2) e a polarização de células inflamatórias inatas no tumor, podem propiciar o desenvolvimento e progressão tumoral. O equilíbrio entre resposta citotóxica e resposta humoral pode ser regulado pelo sistema imunológico do indivíduo (DENARDO; COUSSENS, 2007; CURIGLIANO, 2011).

A ativação de linfócitos T CD4 pode ser classificada em Th1 e Th2, sendo que a primeira libera interferon gama (IFN γ), fator de crescimento tumoral beta (TGF β), fator

de necrose tumoral (TNF) e interleucinas 2 (IL-2), que são citocinas que parecem cooperar com a função de combate tumoral junto aos linfócitos T citotóxicos. Em contraponto, as células Th2 expressam interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13, que promovem perda de citotoxicidade, aumentando a imunidade humoral. Conclui-se assim que as células Th1 beneficiam a função antitumoral, enquanto a Th2 reduz a imunidade antitumoral e aumenta a resposta humoral (GOTO *et al.*, 1991; DENARDO; COUSSENS, 2007).

As células T reguladoras são linfócitos com propriedades imunossupressoras que podem inibir uma resposta antitumoral, provocando prejuízos ao hospedeiro. Através da supressão das funções de ativação das células T virgens e efectoras, as células T reguladoras podem desempenhar um papel deletério na resposta imune tumoral (SAKAGUCHI *et al.*, 2009; CURIGLIANO, 2011; TANCHOT *et al.*, 2013).

Células mieloides imaturas expressam MHC de classe I, sugerindo a indução de células T citotóxicas através da ligação ao complexo receptor, quando ausência de sinais coestimuladores (ALMAND, 2001; OSTRAND-ROSENBERG; SINHA, 2009).

Um subconjunto de células T helper, denominadas Th17, que secreta IL-17, IL-21, IL-22, foram sugeridas como importantes para a imunidade antitumoral, porém, essa informação parece controversa. Embora estudos indiquem que a Th17 dão suporte a uma atividade antitumoral positiva, as células Th17 em localização intratumoral podem ser responsáveis por inflamações crônicas, promovendo evolução tumoral (KRYCZEK *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 2012). Pacientes humanos com câncer de mama podem apresentar imunossupressão em sangue periférico mediado pelo tumor primário, tornando células tumorais circulantes um biomarcador de imunossupressão mediada pelo tumor no microambiente primário (MOHME *et al.*, 2016).

Apesar do crescente número de estudos, ainda pouco se sabe sobre os leucócitos circulantes e infiltrados inflamatórios tumorais e suas relações com a progressão do câncer em caninos (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; SAEKI *et al.*, 2012; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014;). Estudos focados na relação entre inflamação e câncer foram realizados em alguns tipos de tumores em cães, tais como: histiocitoma cutâneo (COCKERELL; SLAUSON, 1979), papiloma oral (KNOWLES *et al.*, 1996), tumor venéreo transmissível (PÉREZ *et al.*, 1998) e seminomas (GRIECO *et al.*, 2004). Nestes

estudos, a relação entre o aumento do infiltrado de linfócitos T e regressão espontânea ou estabilização do crescimento tumoral foi notória.

Nos últimos anos, também tem sido dado destaque ao perfil imunológico nos estudos envolvendo neoplasias mamárias caninas (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; 2012; KIM *et al.*, 2013; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2013). Contudo, o papel das células T no desenvolvimento destas neoplasias precisa ser melhor elucidado. Nos tumores mamários caninos, um maior infiltrado de linfócitos T tem sido relacionado a malignidade (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; SAEKI *et al.*, 2012), assim como uma maior razão T/B tem associação com invasão linfática e grau histológico (KIM *et al.*, 2013), o que sinaliza que as células linfocíticas contribuem para a criação de um microambiente favorável a agressividade tumoral.

Carvalho e colaboradores (2011) ao avaliarem a presença de linfócitos CD3⁺ intratumoral, na periferia do tumor e em uma glândula mamária livre de tumor observaram que pacientes com menor sobrevida global apresentaram maior infiltrado intratumoral de CD3⁺. Estes autores levantaram a hipótese de que uma maior infiltração de linfócitos T CD3⁺ nas áreas não tumorais pode estar relacionado a progressão do tumor, reforçando o papel da resposta imune no desenvolvimento tumoral.

Estrela-Lima e colaboradores (2010) ao estudarem as frações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ demonstraram uma predominância de linfócitos em infiltrado tumoral, sendo o CD4⁺ prevalente em tumores de pacientes com metástases e CD8⁺ em pacientes de melhor prognóstico. Quando foi avaliada a proporção das frações, alta razão entre CD4⁺/CD8⁺ foi associada a menor sobrevida e, por isso, proposta a razão CD4⁺/CD8⁺ \geq 1.8 como biomarcador prognóstico. Felsburg (2002) relata o intervalo da razão CD4⁺/CD8⁺ de 1.5 a 2.0 como dentro dos parâmetros de normalidade para cães saudáveis de até 12 meses. Após esse período a fração CD8⁺ tende a aumentar gradualmente e estabilizar resultando na diminuição da razão CD4⁺/CD8⁺ (FALDYNA *et al.*, 2001; BLAUNT *et al.*, 2005).

O aumento de células T reguladoras (Treg) foram observadas em sangue periférico e nos linfonodos regionais de cães com neoplasia (BILLER *et al.*, 2010), sendo descrito no estudo de Kim e colaboradores (2012) uma associação entre aumento de Treg, invasão linfática e alto grau histológico. Esses achados sugerem que as células Treg podem desempenhar um importante papel na progressão dos tumores mamários em cães.

Esse estudo sugere também a utilização dos valores de Treg como fator prognóstico do paciente.

Para Estrela-Lima e colaboradores (2010), a maior estabilidade imunológica resulta da relação de proporcionalidade dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em cadelas portadoras de tumores mamários e a avaliação desta razão pode ser utilizada como biomarcador prognóstico capaz de segregar cadelas com alta probabilidade de sobrevivência, podendo assim, influenciar em condutas terapêuticas na rotina clínica oncológica.

4.5 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

Marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor e poder ser classificados como fatores prognósticos e/ou preditivos. Fatores prognósticos são características específicas de indivíduos e dos processos relativos aos seus tumores que permitem antever a evolução clínica do paciente, sem a interferência de terapias complementares, além da cirúrgica (ALLRED *et al.*, 1998). Já os fatores preditivos são características que permitem selecionar pacientes e direcionar terapias específicas, traçando esquemas terapêuticos individualizados (MARINHO *et al.*, 2008).

O conhecimento acerca dos fatores prognósticos e preditivos é de extrema importância, uma vez que pacientes oncológicos clinicamente semelhantes podem apresentar neoplasias morfológicamente parecidos, no entanto com comportamentos biológicos completamente distintos (ZUCCARI *et al.*, 2008). Essas informações, certamente, direcionam a condutas terapêuticas diferenciadas onde alguns indivíduos com pior prognóstico tem a necessidade de tratamento complementar, outros apresentam melhor prognóstico e por isso dispensam terapias adjuvantes, além dos casos em que é possível estabelecer protocolos de tratamento mais específicos e personalizados (CLARK, 1996).

Alguns fatores prognósticos já são bem estabelecidos na avaliação do câncer de mama em ambas as espécies humana e canina, tais como o tamanho do tumor, tipo

histológico e graduação histológica (CAVALCANTI, 2006b). O fator prognóstico mais utilizado na rotina oncológica é o estadiamento clínico, realizado com base no sistema TNM (modificado de Owen, 1980) onde leva-se em consideração o tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M). A partir da avaliação dos escores, são atribuídos estadios que variam de I a V e quanto maior o estadio, pior a expectativa de vida do paciente. O tamanho tumoral (T) é considerado por muitos pesquisadores a característica mais importante, sendo por si só um fator prognóstico independente (SORENMO *et al.*, 2003; CAVALCANTI, 2006). Tumores menores que três centímetros, de forma geral, conferem melhor prognóstico (T1). Já os tumores maiores que cinco centímetros, via de regra, apresentam comportamento maligno, alta taxa de proliferação celular e independência hormonal (FERREIRA *et al.*, 2009), conseqüentemente, pior prognóstico com menor tempo de sobrevida global. Nestes casos, deve ser considerada a necessidade de tratamento complementar a cirurgia (CAVALCANTI, 2006).

O comprometimento do linfonodo regional ou mais linfonodos (N1) indica que a doença já saiu dos limites do sítio inicial. A invasão linfática confere uma menor expectativa de sobrevida global ao paciente (YAMAGAMI *et al.*, 1996). Araújo e colaboradores (2015) concluíram que o aumento do número de linfonodos acometidos é inversamente proporcional ao prognóstico e sobrevida. Já o diagnóstico de metástase à distância (M1) confere um prognóstico ainda pior, devido à disseminação sistêmica da doença e redução do tempo de sobrevida da paciente.

A classificação histopatológica é considerado um fator prognóstico independente no câncer primário de mama tanto na mulher quanto na cadela. Esta ferramenta define o tipo e subtipo tumoral, sendo importante para reconhecimento do comportamento biológico do tumor, bem como para embasar medidas terapêuticas, clínicas e cirúrgicas (CALDAS *et al.*, 2016). A partir da avaliação microscópica ainda é possível determinar a graduação histológica do tumor, ou seja seu potencial de malignidade que é estabelecido com base em critérios como o índice de formação tubular, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica (ELSTON; ELLIS, 1991; CASSALI *et al.*, 2014).

No câncer de mama, o estudo da expressão de proteínas específicas como marcadores de fator prognóstico e preditivo têm se revelado importante ferramenta de

trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa nas espécies humana e canina (KANDIOLER-ECKERSBERGER, 2000). Entre essas proteínas podemos citar: receptores hormonais (estrógeno e progesterona); proteína dos genes BRCA 1 e p53 (supressores tumorais); marcadores de proliferação celular (MIB-1/Ki67), e o proto-oncogene c-erbB-2/HER-2 receptor do fator de crescimento epidérmico (ZUCARI *et al.*, 2008; CASSALI *et al.*, 2014; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2017).

A expressão dos receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), sabidamente, apresenta relação com maior sobrevida e melhor prognóstico (MISDORP, 2002). Em neoplasias mamárias malignas, a redução de expressão destes receptores denota independência hormonal, sugerindo maior autonomia das células tumorais (GERALDES *et al.*, 2000). Outro importante marcador prognóstico é o índice de proliferação celular avaliado através da expressão de Ki67 pela técnica de imunohistoquímica. Esta proteína nuclear está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase de repouso (BUITRAGO *et al.*, 2011) e apresenta-se notavelmente mais expressa em tumores de caráter maligno, sobretudo nos menos diferenciados (GAL *et al.*, 2015).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (HER-2) é um proto-oncogene geralmente superexpresso em neoplasias mais agressivas, tem relação com desenvolvimento de metástase e aumento da expressão do marcador Ki67 (NOVAK *et al.*, 2005). Essa condição, também está associada a resistência a alguns tipos de tratamentos (FERRERO-POUS *et al.*, 2000) e ao maior risco de recidiva local (PRESS *et al.*, 1997), porém a presença do receptor também indica possibilidade de utilização de terapias específicas, sendo portanto, um importante fator preditivo (PICCARD-GEBHART *et al.*, 2005; GRINGAS *et al.*, 2015). Na literatura veterinária, a avaliação da expressão de HER-2 é bastante estudada em cadelas e gatas com neoplasias mamárias, entretanto, devido a grande variabilidade de resultados, ainda existem muitas controvérsias quanto ao seu papel como fator prognóstico nestas espécies (GERALDES *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2004; BERTAGNOLLI *et al.*, 2009; PENA *et al.*, 2014).

Outros exemplos de marcadores utilizados na avaliação do microambiente tumoral incluem o CD31, marcador de endotélio vascular altamente expresso durante o processo de angiogênese e, portanto, está relacionado a maior agressividade tumoral (LAVALLE *et al.*, 2009; MOHAMED *et al.*, 2011); moléculas de adesão como a E-caderina ou B-catenina, cuja expressão indica manutenção da compactação das células,

deixando o tecido tumoral mais estável e menos sujeito ao desenvolvimento de metástases (GLOUSHANKOVA, 2008); além do gene supressor tumoral (P53), denominado “guardião do genoma” que tem o importante papel de bloquear a progressão da divisão de células defeituosas e, também, caso falhe nesse primeiro episódio, tem a função de disparar a cascata de apoptose (EISENBERG; KOIFMANN, 2001). Mutações nesse gene podem desencadear a transformação de células neoplásicas, por isso sendo considerado um proto-oncogene.

Um importante marcador prognóstico e preditivo utilizado na rotina oncológica é a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-2 tem importante papel nos processos inflamatórios e sua expressão também tem sido associada ao crescimento tumoral, invasão e desenvolvimento de metástases (GOTELY, 2000). Esta enzima atua também no fator de crescimento tumoral, podendo inibir a apoptose (GOTELY, 2000; LI, 2004). Em carcinomas mamários, o uso de inibidores da COX-2 seletivo tem sido relacionado a supressão do crescimento de células tumorais (SAÍTO *et al.*, 2014), assim como com aumento de sobrevida, sendo considerado um importante fator preditivo (LAVALLE *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2014; ARENAS *et al.*, 2016). Souza e colaboradores (2009) também observaram melhora de condição clínica, controle da doença e aumento de sobrevida global em cadelas diagnosticadas com carcinoma inflamatório. Este tipo de terapia tem sido recomendada devido à ausência de mecanismos de resistência e efeitos colaterais menos severos nas pacientes (TRAN *et al.*, 2014).

A avaliação do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral, em especial nos tumores mamários, também tem despertado grande interesse na oncologia humana e atualmente também na veterinária como um possível marcador prognóstico. Acredita-se que a depender dos tipos e subtipos celulares envolvidos e da intensidade da inflamação, observam-se diferentes funções na progressão ou regressão tumoral, na resposta ao tratamento, bem como, nas taxas de sobrevida (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; HEYS *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; SAEKI *et al.*, 2012).

Nas mulheres, estudos demonstram que os carcinomas mamários são infiltrados por diversos tipos de leucócitos, predominantemente macrófagos e linfócitos T, que desempenham funções imunomoduladoras. A identificação de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, macrófagos e citocinas (IL-2, IL-6, IL12, dentre outras) pode

auxiliar a indicação prognóstica de mulheres com câncer de mama de forma eficaz e sensível (CAMPBELL *et al.*, 2005; MATKOVSKI *et al.*, 2009).

Stewart e Heppner (1997) concluíram que um maior infiltrado linfocítico pode estar relacionado a recidiva tumoral de câncer de mama em mulheres jovens. Isto, por que, mesmo que o tumor esteja repleto de células inflamatórias, existe uma incapacidade imunológica em barrar ou frear o desenvolvimento tumoral. Por outro lado, DeNardo e Coussens (2007) concluíram que a presença de linfócitos T em tumores de crescimento rápido apresenta uma correlação positiva com a ausência de metástase em linfonodo regional, menor graduação histológica e maior sobrevida global, o que o habilita como um indicador prognóstico relevante.

O estudo realizado por Estrela-Lima e colaboradores (2010), analisando o infiltrado inflamatório associado ao tumor em cadelas, além de definir o linfócito como principal tipo celular, seguido dos macrófagos, também revelou ser os linfócitos T CD4⁺ predominantes nos carcinomas e carcinoma em tumor misto com metástase, e as células T CD8⁺ relacionadas aos carcinomas em tumores mistos sem metástases, ou seja, T CD4⁺ relacionado a evolução neoplásica enquanto T CD8⁺ ao combate tumoral.

Em medicina, os marcadores séricos também são extremamente importantes para avaliação do curso da doença. A análise de CEA, CA15.3 e das enzimas LDH e fosfatase alcalina auxiliam no prognóstico e detecção de recidivas em mulheres com câncer de mama, enquanto as dosagens de proteínas totais e albumina auxiliam na avaliação do estado nutricional da paciente (SOUZA, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2005). O CA15.3 possui importância fundamental no acompanhamento da evolução do câncer de mama na mulher, podendo preceder os sinais clínicos em até 13 meses e na avaliação de falha ou sucesso terapêutico (WU *et al.*, 2010). Sua sensibilidade varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005), apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama (CHEUNG *et al.*, 2000). Em medicina veterinária esses marcadores ainda são pouco estudados. Campos e colaboradores (2012) avaliaram as concentrações séricas de CEA, CA15.3, fosfatase alcalina e LDH em cadelas híginas e cadelas com câncer de mama com e sem metástase e verificaram uma correlação entre o marcador tumoral sérico CA15.3 e o estadiamento do câncer de mama na cadela.

Em um estudo para determinação do perfil de leucócitos no sangue periférico de cadelas com carcinomas mamários, Estrela-Lima e colaboradores (2012) observaram que os linfócitos T CD4⁺ estão associados à progressão tumoral, enquanto os linfócitos T CD8⁺ inibem o desenvolvimento tumoral. A partir desta análise, os autores propuseram a utilização de dois parâmetros como biomarcadores, a razão CD4⁺/CD8⁺ e a Intensidade Média de Fluorescência do MHC em monócitos os quais apresentaram significativo valor clínico e prognóstico, possibilitando a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência ou morte, respectivamente. Estudos com essa temática podem auxiliar a melhor compreensão sobre a heterogeneidade imunológica dos carcinomas mamários caninos, fornecendo ferramentas alternativas no estabelecimento de possíveis protocolos terapêuticos baseados no perfil imunofenotípico desses tumores.

Todas as ferramentas capazes de auxiliar no diagnóstico precoce e monitoramento da doença são de extrema importância para determinar o prognóstico para o paciente. Desta forma, a forte associação entre tumores mamários nas cadelas e leucócitos, presentes em infiltrados tumorais ou no sangue periférico, representa perspectivas para a utilização do perfil imunológico do paciente, como possíveis biomarcadores prognósticos e preditivos

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo ocorreu dentro das normas de uso e experimentação animal, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), sob protocolo de nº 11/2013 (Anexo 1).

5.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto (HOSPMEV/UFBA), na cidade de Salvador, Bahia e envolveu os seguintes setores: Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Diagnóstico por Imagem, Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Patologia Veterinária. Como instituições parceiras, participaram da pesquisa o Centro de Pesquisas René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (Belo Horizonte, Minas Gerais) e o Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia), representado pelo Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) e o Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI).

5.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram selecionadas 100 fêmeas caninas, de diferentes raças, com idade variando entre cinco a 18 anos, atendidas no HOSPMEV/UFBA, no período de março de 2014 a fevereiro de 2016. Nenhum dos animais estudados fez uso prévio (mínimo de trinta dias) de fármacos antineoplásicos ou antiinflamatórios, sendo este aspecto um critério de exclusão dos animais na pesquisa. Todas as cadelas eram domiciliadas e participaram da pesquisa com autorização dos tutores por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: Grupo 1: Controle, constituído por fêmeas híginas, sem histórico de neoplasia mamária; Grupo 2, animais

com diagnóstico histopatológico de Carcinoma em Tumor Misto (MCT); e Grupo 3, animais com diagnóstico histopatológico de outros Carcinomas (MC). Os Grupos 2 e 3 ainda foram subdivididos de acordo com o tratamento em: tratados apenas com cirurgia e tratados com cirurgia e quimioterapia, conforme demonstrado na Figura 1.

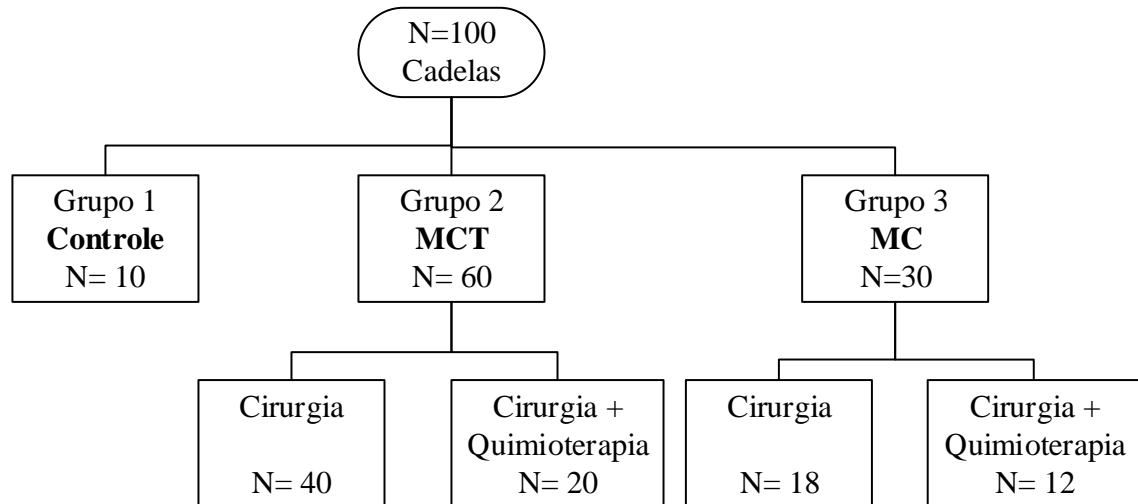


Figura 1 - Organograma dos grupos experimentais participantes da pesquisa. Grupo 1, correspondente ao grupo controle, constituído por cadelas híginas; Grupo 2, cadelas com MCT, subdivididas em tratamento com cirurgia e; tratadas com cirurgia e quimioterapia. Grupo 3, cadelas com MC subdivididas em tratamento com cirurgia e; tratadas com cirurgia seguido quimioterapia.

5.3 AVALIAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA

Inicialmente, todos os animais com suspeita de neoplasia mamária foram submetidos ao exame clínico. Este exame consistiu na coleta de informações sobre o histórico clínico e ciclo reprodutivo (cio regular, número de partos, castração, utilização de tratamento hormonal, abortos, período de desenvolvimento das lesões, histórico de pseudociese e lesões prévias). Estas informações foram armazenadas em uma ficha oncológica específica, segundo o protocolo modificado de Ferreira *et al.* (2003) (Anexo 3). Em seguida, os animais foram submetidos ao exame físico completo, que consistiu na mensuração da frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal. Foram também avaliadas a coloração de mucosas, associada ao tempo de preenchimento capilar e o estado de hidratação. Todos os sistemas foram avaliados, iniciando-se pela cabeça,

passando pela região cervical, torácica e abdominal até chegar aos membros (Figuras 2A e 2B).



Figura 2 - Avaliação clínica, mastectomia e procedimento quimioterápico em cadelas com carcinoma mamário. A e B. Anamnese e exame físico em cadela com neoplasia mamária atendida no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. C e D. Procedimento cirúrgico (mastectomia radical unilateral) com retirada dos linfonodos inguinais em cadela com tumor mamário. E. Pós-operatório imediato F Cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina endovenosa.

No exame específico das glândulas mamárias, foi realizada a palpação de toda cadeia mamária, assim como dos linfonodos inguinais e axilares. Os tumores foram mensurados em pelo menos duas dimensões. Quando o animal apresentou mais de um nódulo, cada um deles foi medido separadamente, sendo considerada para a realização do estadiamento clínico a maior medida do tumor invasivo, conforme critérios adotados pelo sistema TNM (Anexo 4). A avaliação macroscópica dos linfonodos inguinais e axilares foi realizada pela palpação dos mesmos, e a presença ou não de envolvimento neoplásico foi determinada pelo exame histopatológico após a exérese cirúrgica da mama envolvida.

Após a finalização da avaliação física, o sangue periférico foi colhido para realização de hemograma e perfil bioquímico sérico (ureia, creatinina, FA, ALT, cálcio e glicose), como avaliação geral pré-operatória. Por conseguinte, as cadelas foram

encaminhadas para realização de radiografia simples de tórax em três incidências (lâtero-lateral direita (LLD), lâtero-lateral esquerda (LLE) e ventro-dorsal (VD) para pesquisa de metástase pulmonar e linfadenomegalia, além da ultrassonografia abdominal total para verificação de metástase abdominal.

5.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

No pré-operatório, os animais foram submetidos a jejum alimentar de oito horas e hídrico de duas horas. Antes do procedimento cirúrgico (50 minutos antes da mastectomia) foram colhidos 4 mL de sangue periférico para realização do perfil imunofenotípico.

O protocolo anestésico adotado foi cloridrato de morfina a 1% na dose de 0,5 mg/kg via intramuscular, seguido após 15 minutos por cloridrato de clorpromazina a 0,5% na dose de 0,5 mg/kg via endovenosa, como medicações pré-anestésicas. A indução anestésica foi feita com propofol a 1% na dose de 4 mg/kg via endovenosa, e mantida com isoflurano em circuito circular valvular com absorvedor. Foi aplicado como antibiótico, a cefalotina (Cefalotina sódica[®] 1g – ABL - São Paulo) 30 mg/kg via endovenosa, e anti-inflamatório o meloxicam (Maxicam[®] 2% - Ourofino – São Paulo) 0,2 mg/kg via endovenosa, ambos administrados trinta minutos antes do procedimento cirúrgico.

Após tricotomia e antissepsia da região abordada, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal. O tipo de abordagem cirúrgica realizada foi a mastectomia radical unilateral com a retirada dos linfonodos inguinais em todos os casos (Figuras 2C e 2D). Os cuidados pós-operatórios imediatos constaram de analgesia à base de cloridrato de tramadol a 5% (Cristália - São Paulo) 3 mg/kg, via subcutânea e recuperação da temperatura corporal com aquecimento.

Após a cirurgia e adequada recuperação anestésica, com retorno da temperatura corporal normal, os animais foram liberados para os cuidados pós-operatórios em casa ou para internamento em clínica veterinária particular. Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água *ad libitum*. Os cuidados pós-operatórios constaram de cloridrato de ranitidina, na dose de 2 mg/kg via oral, cada 12 horas, por 10 dias,

amoxicilina com clavulanato de potássio, na dose de 20 mg/kg via oral, cada 12 horas, por 10 dias, carprofeno, na dose de 2,2 mg/kg via oral, cada 12 horas, por quatro dias, cloridrato de tramadol, na dose de 3 mg/kg via oral, cada 8 horas, por cinco dias, dipirona, na dose de 25 mg/kg via oral, cada 8 horas, por sete dias.

Durante o período pós-operatório, as cadelas foram acompanhadas com utilização de bandagem compressiva por 48 horas. Todos os animais fizeram uso de roupa pós-cirúrgica até a retirada dos pontos de pele. Neste período, foram avaliados parâmetros fisiológicos, de comportamento e as possíveis complicações da ferida cirúrgica. Após 15 dias do procedimento cirúrgico, os pontos de pele foram retirados e os pacientes do Grupo 2 e 3 com indicação para quimioterapia (gradação histopatológica \geq II e/ou presença de metástase para linfonodo regional, além da razão $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ para cadelas do grupo MCT e taxa de IMF ≤ 100 para animais do grupo MC) foram encaminhados para tratamento quimioterápico.

5.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a finalização do procedimento cirúrgico, a cadeia mamária afetada, incluindo pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, foram colocados em recipientes com formol e encaminhados ao setor de Patologia Veterinária para caracterização macro e microscópica. Os fragmentos colhidos foram coletados em frasco identificado, contendo formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processado pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Concluída a etapa de processamento da amostra, os cortes histológicos medindo 4 μ m foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (H.E.) e analisados em microscópio óptico convencional.

As neoplasias foram classificadas microscopicamente de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors* (CASSALI *et al.*, 2014). Para a gradação histológica foi utilizado o grau histológico de Nottingham (RICHARDSON modificado por ELSTON; ELLIS, 1993), que inclui: percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (ELSTON; ELLIS, 1993) (Anexo 5). Foram

utilizadas as áreas de invasividade dos tumores para classificá-los em Grau I, Grau II e Grau III (Figura 3).

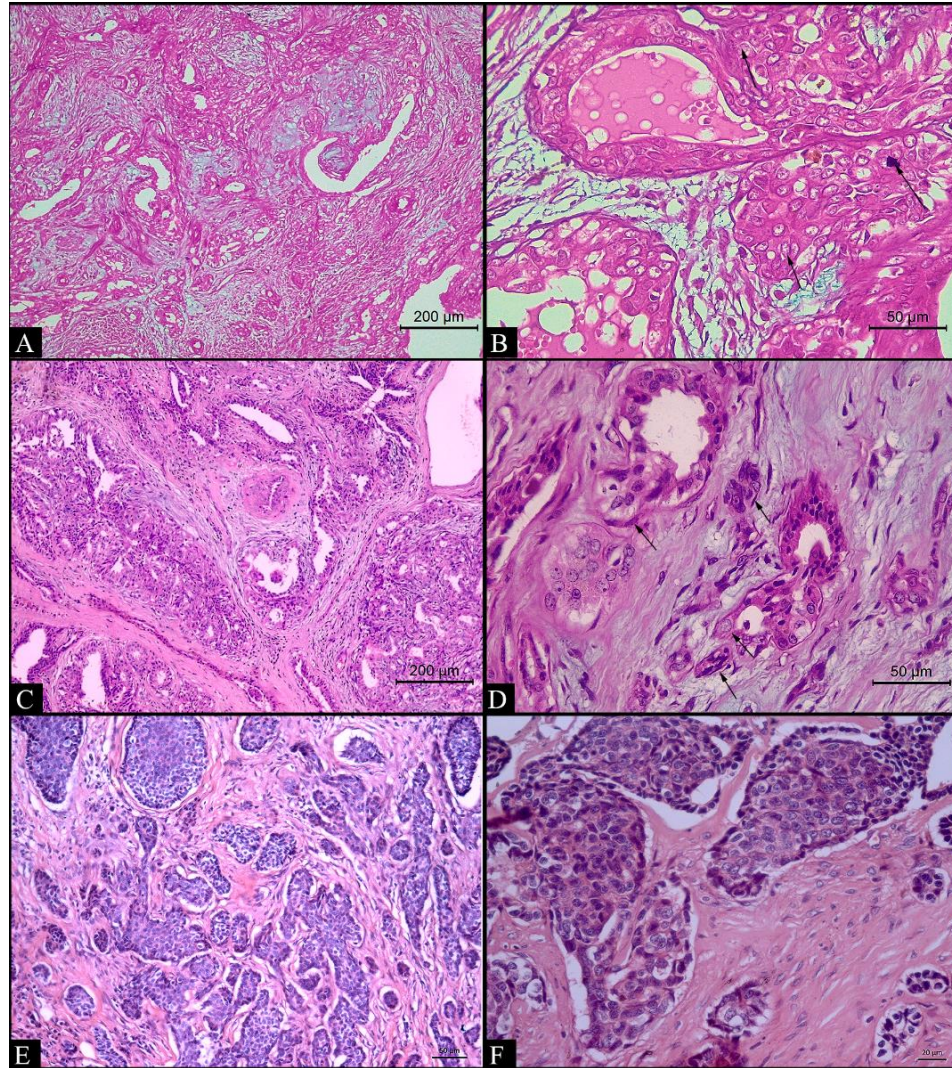


Figura 3 Fotomicrografia, HE, Carcinoma mamário: A) Grupo MCT, Carcinoma em Tumor Misto Grau I: proliferação neoplásica de crescimento infiltrativo caracterizada por formação tubular, por vezes, papilar, associada à discreta produção de matriz mixóide, sustentada por um estroma moderado. 100x. **B)** Detalhe de A, pequenos aglomerados de células epiteliais focais (seta), discretamente pleomórficas invadindo o estroma adjacente. 400x. **C) Grupo MCT, Carcinoma em Tumor Misto Grau II:** Proliferação de células epiteliais de crescimento infiltrativo, caracterizada por formação tubular, associada à moderada produção de matriz mixóide, sustentadas por um estroma escasso. 100x. **D)** Detalhe de C, formações de cordões e aglomerados de células epiteliais, moderadamente pleomórficas (seta menor), invadindo o estroma adjacente com presença de mitose atípica (seta maior), 400x. **E) Grupo MC, Carcinoma Sólido:** Proliferação neoplásica de crescimento infiltrativo caracterizada pela formação de aglomerados sólidos sustentados por estroma conjuntivo desenvolvido. 200x.; **F)** Detalhe de E, aglomerado sólido de células epiteliais (seta) moderadamente pleomórficas, 400x

5.6 IMUNOFENOTIPAGEM EM SANGUE PERIFÉRICO

Obtenção do Sangue Periférico

Para avaliação da resposta imune celular no contexto *ex vivo* (células vivas fora do corpo, mas em meio controlado), foram colhidos 4 mL de sangue de todos os animais, imediatamente antes do procedimento cirúrgico. O sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis de 5 mL, através de venopunção da jugular e, em seguida, transferido para tubos estéreis contendo EDTA, mantido a temperatura de 4°C.

Ensaio de Imunofenotipagem Celular em Sangue Periférico

Os anticorpos monoclonais utilizados (Tabela 1) foram diluídos em SDA em diluições e combinações previamente estabelecidas na padronização do protocolo proposto por Estrela-Lima *et al.* (2012).

Tabela 1. Painel de anticorpos monoclonais utilizados nos ensaios de imunofenotipagem celular em sangue periférico de cadelas portadoras de carcinomas mamários.

Anticorpo Monoclonal*	Hospedeiro	Clone	Fluorocromo	Diluição	Células alvo
Anti CD3/CD4/CD8 canino	Rato	647TC014	FITC/RPE/ AlexaFluor 647®	1/10	Linfócitos T/ T auxiliar/citotóxico
Anti-CD14 Humano	Camundongo	TÜK4	RPE	1/10	Monócitos e granulócitos
Anti-CD21 Canino	Camundongo	CA2.1D6	RPE	Puro	Linfócitos B
Anti-MHC-I Camundongo	Camundongo	2G5	AlexaFluor 647®	Puro	Células nucleadas
Anti-MHC-II Canino	Rato	YKIX334.2	FITC	Puro	Células mononucleadas

* Todos anticorpos utilizados foram produzidos pela ABD Serotec *Bio-Rad Laboratories*

Em quatro tubos cônicos de poliestireno de 12x75 mm (FALCON® – BECTON DICKINSON) contendo cada quantidade específica de anticorpos diluídos ou puro, foram

adicionados 40 µL de sangue total colhidos, como descrito no item “Obtenção do Sangue Periférico”. As amostras de sangue periférico foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas por 30 minutos, sob temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as hemácias foram lisadas adicionando-se 3 mL de solução de lise (FACS LISYNG SOLUTION – BECTON DICKINSON), sob agitação no vórtex. As suspensões celulares permaneceram em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz; após este período, as mesmas foram centrifugadas a 382 xg por cinco minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo-se os tubos e as células foram então, homogeneizadas no vórtex a baixa velocidade.

Foram adicionados 3 mL de PBS e as suspensões celulares foram submetidas novamente a centrifugação a 382 x g, por cinco minutos, foi novamente desprezado o sobrenadante e, o sedimento ressuspensionado e homogeneizado cuidadosamente; esta última lavagem foi repetida mais uma vez. As células foram fixadas com 100 µl de solução fixadora para citometria – MaxFacsFix (MFF) (10,0g/l de paraformaldeído, 10,2 g/l de cacodilato de sódio e 6,65 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2) e submetidas à leitura no citômetro de fluxo, onde foram avaliados 20 mil eventos. Os controles negativos foram obtidos da empresa correspondente apresentando mesmo isotipo e produzidos na mesma espécie.

Obtenção e análise de dados por citometria de fluxo

Para a realização dos ensaios de imunofenotipagem das células obtidas a partir do sangue periférico de cadelas, foram utilizados anticorpos monoclonais que permitiram a marcação das seguintes populações celulares; anti CD14 para marcação dos monócitos, anti células B para linfócitos B, anti CD3 para marcação de linfócitos T e anti CD4 e CD8 para as subpopulações de linfócitos T. Foram também utilizados anticorpos anti-moléculas de MHC I e MHC II. Os anticorpos eram marcados com fluorocromos FITC (Isotiocianato de fluoresceína - emitiam fluorescência tipo 1 -FL1), R-PE (Ficoeritrina – emitiam fluorescência tipo 2 - FL2) ou com PE-Cy-5 (ficoeritrina conjugada com cianina - emitiam fluorescência tipo 3 - FL3). Assim, foram utilizadas marcações duplas que permitiram a análise simultânea de mais de um parâmetro por tubo.

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

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

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

Avaliação dos percentuais de CD4⁺ e CD8⁺ dos MCT's nos Graus I e II

Foi realizada a fenotipagem das subpopulações de linfócito T (CD4⁺ e CD8⁺) nos pacientes portadores de carcinoma em tumor misto (MCT) Grau I e Grau II sem

metástase regional objetivando verificar possíveis alterações nestas subpopulações que ajudassem a ratificar, diante da sua maior agressividade observada na rotina oncológica, a necessidade de prescrição de tratamento quimioterápico em cadelas do grupo MCT, com graduação histológica igual ou superior a II mesmo sem acometimento de linfonodos regionais.

Para esta comparação, foram avaliados 44 animais (22 portadores de tumor grau I e 22 de tumores Grau II). Quando se estratificou os casos de MCT quanto a graduação histológica, dividiu-se o grupo em dois subgrupos G1 (Grau I) e G2 (Grau II).

Avaliação do desempenho dos parâmetros fenotípicos celulares

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

A *receiver operating characteristic curve* (curva ROC) foi construída aplicando-se na ordenada os valores de co-positividade e na abscissa o complemento da co-negatividade. Utilizou-se esta curva para a seleção do ponto de corte, como o valor que discrimina os resultados em positivos ou negativos. A análise da curva ROC permitiu ainda o cálculo da acurácia global dos parâmetros, avaliada através da área sob a curva ROC-ASC20. Para construir as curvas ROC para os parâmetros avaliados, utilizou-se o programa estatístico *MedCalc Statistical*. Os intervalos de confiança de 95% foram calculados, utilizando o programa *Confidence Interval Analysis (CIA) for Windows*.

5.7 QUIMIOTERAPIA COM CARBOPLATINA

Os critérios para inserção das cadelas no tratamento quimioterápico foram para o grupo MCT: presença de metástase regional e/ou a distância, grau histológico \geq II e

razão $CD4^+ / CD8^+ < 1.8$ e para o grupo MC: qualquer grau histológico, presença de metástase regional e/ou a distância, IMF MHC-I em monócitos ≤ 100 .

Cerca de vinte dias após o procedimento cirúrgico, foram iniciadas as sessões de quimioterapia utilizando a carboplatina endovenosa, na dosagem de 300 mg/m^2 , com tempo de infusão de cinco minutos, sendo um ciclo totalizando seis sessões com intervalos de 21 dias. Aproximadamente 24 horas antes do início de cada sessão de quimioterapia, foram realizados hemograma e bioquímica sérica (ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina amino transferase, cálcio e glicose) para a avaliação do estado geral do paciente, que foram repetidos também com sete e 14 dias após a administração do quimioterápico. No protocolo para a quimioterapia, as cadelas foram submetidas à fluidoterapia endovenosa com solução fisiológica quatro horas antes e quatro horas após a administração da carboplatina, além da aplicação de metoclopramida ($0,5 \text{ mg/kg}$), ranitidina (2 mg/kg) e prometazina ($0,1 \text{ mg/kg}$), todos por via subcutânea. Os mesmos medicamentos foram ainda prescritos, via oral, por três dias consecutivos.

A quimioterapia foi realizada em uma sala exclusiva, sendo a carboplatina previamente manipulada em uma capela de exaustão para a individualização da dose de cada paciente e administrado por um médico veterinário devidamente paramentado (máscara, luva, gorro e avental descartável). Os resíduos foram devidamente identificados e descartados separadamente, de acordo com o padrão para produtos contaminados com agentes antineoplásicos.

5.8 ACOMPANHAMENTO E SOBREVIDA

Para o acompanhamento dos pacientes foram realizados exames clínicos e laboratoriais (hemograma e bioquímica sérica – ureia, creatinina, fosfatase alcalina e alanina amino transferase, cálcio e glicose), além de radiografia simples de tórax em três incidências. Este acompanhamento foi realizado trimestralmente, por um período de até dois anos após o procedimento cirúrgico, objetivando a avaliação da sobrevida global. O tempo de sobrevida global foi definido (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data do óbito pela doença.

Os animais que evoluíram para o óbito, quando autorizado pelo proprietário por escrito em formulário específico, foram necropsiados no Setor de Anatomia

Patológica/HOSPMEV-UFBA para determinação da causa mortis e detecção de possíveis metástases (Anexo 7). Foram colhidos fragmentos de todos os órgãos, com indicação macroscópica de metástases, para avaliação histopatológica.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram agrupados da seguinte forma: tamanho do tumor (3 - 5 cm ou > 5 cm), metástase para linfonodos (sim ou não), estadiamento clínico (II, III, IV ou V), graduação histológica (I, II ou III), utilização da quimioterapia com carboplatina (sim ou não), percentual de linfócitos CD4⁺, percentual de linfócitos CD8⁺, razão CD4⁺/CD8⁺ (baixa: menor ou igual a 1,8, e alta: maior que 1,8), percentual de monócitos CD14⁺, percentual de linfócitos B, percentual de MHC-I, percentual de MHC-II, taxa de IMF (baixa: menor ou igual a 100, e alta: maior que 100) e taxa de sobrevida (baixa: menor que 180 dias/seis meses e alta: maior que 180 dias/seis meses).

Inicialmente, para avaliação da normalidade da distribuição, os dados foram submetidos a teste de Kolmogorov-Smirnov. Para variáveis com distribuição normal utilizou-se o teste t de (comparação de dois grupos) e ANOVA (comparação de mais de dois grupos). Já para variáveis sem distribuição normal, foram utilizados o teste Mann-Whitney (dois grupos) e Kruskal-Wallis ((mais de dois grupos). Da mesma forma, possíveis correlações foram investigadas pelos testes de Spearman. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) na análise univariada.

Fatores prognósticos como estadiamento, graduação, tamanho do tumor, taxa de sobrevida, relação CD4⁺/CD8⁺ e IMF de MHC-I em monócitos foram analisados utilizando a regressão logística. Em todos os testes, valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA), SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e MedCalc for Windows na versão 15.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ACHADOS CLINICO-PATOLÓGICOS

Foram estudadas 100 cadelas, 10 híginas sem histórico de neoplasias mamárias (grupo controle) e 90 cadelas com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário. A idade das cadelas variou entre cinco a 18 anos, com maior frequência de animais entre 10 e 14 anos (61,1%). Este resultado aponta concordância com os dados da literatura no Brasil, que define a maior frequência entre 10 e 13 anos (BENJAMIN *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003; PIRES *et al.*, 2009; FURIAN *et al.*, 2007; PIEKARZ, 2009; CARNEIRO, 2015) e com relação a literatura internacional, que indica maior frequência em pacientes entre 7 e 12 anos, o que sugere um acometimento um pouco mais tardio dos animais estudados (MISDORP, 2002; SORENMO *et al.*, 2013). Não há estudos que indiquem relação entre a idade do paciente e alteração no prognóstico (PHILIBERT *et al.*, 2003). Contudo, o acometimento de animais jovens até dois anos de idade é uma situação pouco frequente, como confirmado pelos resultados deste estudo, no qual o paciente mais jovem possuía cinco anos de idade.

Constatou-se, ainda, que os tumores de mama acometem animais de todos os portes, predominantemente cães sem raça definida (SRD) 55,5% (50/90), seguida por cães da raça Poodle 23,3% (21/90). Alguns autores indicam maior acometimento de raças de pequeno porte e predisposição genética das raças Maltês, Yorkshire Terrier, Shitzu e Poodle para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (SCHAFER *et al.*, 1998; IM *et al.*, 2013). Estudos realizados no Brasil indicam maior frequência de tumores mamários em Poodles e cães sem raça definida (CAVALCANTI; CASSALI, 2006; FURIAN *et al.*, 2007; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; TORÍBIO *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2012; LAVALLE *et al.*, 2012; VIEIRA-FILHO, 2015; MACHADO, 2015; PEREIRA, 2016; CONCEIÇÃO, 2017). Porém, Hataka (2004) credita o maior acometimento dos Poodles a popularização da raça e a existência de diversas linhagens e misturas entre elas. Segundo Peleteiro (1994) e Cassali e colaboradores (2014) ainda não existem subsídios que possibilitem inferir sobre predisposição racial para o desenvolvimento de tumores mamários na cadela.

Com base no histórico reprodutivo dos animais estudados, verificou-se que 22,2% (20/90) já apresentaram pseudogestação, sendo esta a alteração mais frequentemente observada. Em 33,3% (30/90) do total de casos, os proprietários admitiram a utilização de progestágeno, mas não sabiam informar com exatidão a sua frequência e dosagem. O uso de progestágenos para inibição do estro, a pseudociese, a obesidade e dietas ricas em gorduras, bem como, o estresse oxidativo e a inflamação tem sido citados como fatores de risco associados ao câncer de mama (PELETEIRO, 1994; PEÑA *et al.*, 1998; ALENZA *et al.*, 2000; ZUCCARI *et al.*, 2008; CLEARY *et al.*, 2010; YEON *et al.*, 2011). Sabe-se que a utilização de hormônios exógenos, progesterona ou estrógeno, aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas. Mesmo em baixas doses a progesterona exógena pode induzir neoplasias benignas. Enquanto a combinação destes dois hormônios, pode induzir o desenvolvimento de tumores malignos (GOLDSCHMIDT *et al.*, 2017).

Com relação a localização, distribuição e tamanho dos tumores estudados, a análise dos dados revelou predominância de tumores multicêntricos em 88,8% (80/90) dos casos, com comprometimento bilateral da cadeia mamária em 77,8% (70/90) das pacientes, sendo as mamas inguinais e abdominais mais frequentemente acometidas, em 53,3% (48/90) e 30% (27/90) respectivamente. Em contrapartida, a ocorrência de tumor mamário apenas nas mamas torácicas representou 16,7% (15/90) do total dos animais. Moulton (1990) justifica a maior frequência nas mamas abdominais e inguinais devido a abundância de parênquima mamário que intensifica a proliferação celular em resposta a influência hormonal.

Neste estudo, os animais com tumores em estágio avançado de crescimento (maiores que 5 cm) representaram 72,2% (65/90) dos casos, enquanto tumores com tamanho entre 3 e 5 cm representaram 27,8% (25/90). A predominância de tumores grandes, importante fator prognóstico relacionado à sobrevida, observada nas pacientes atendidas no Hospital Veterinário da UFBA, sugere uma demora na procura pelo atendimento médico veterinário, sendo que tal fato pode ser explicado devido ao baixo poder aquisitivo dos guardiães correlacionados com fatores sócio-culturais (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2003; TORIBIO, 2008).

Para graduação histopatológica dos MCT foram utilizadas as áreas de invasividade dos tumores, sendo estes classificados em Grau I, Grau II e Grau III. Assim

como o tamanho tumoral, envolvimento neoplásico de linfonodos, invasividade, presença de êmbolos neoplásicos e atividade mitótica, a graduação histopatológica é considerada um importante indicador prognóstico no câncer de mama tanto na mulher quanto na cadela (UVA *et al.*, 2009; CASSALI *et al.*, 2014; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2017). Tal parâmetro, realizado apenas nos tumores malignos, tem como objetivo avaliar o grau de diferenciação e proliferação da neoplasia, as variações morfológicas do núcleo e o índice mitótico, apresentando importante correlação com agressividade e consequentemente com o prognóstico (ELSTON; ELLIS, 1991).

Os fatores prognósticos avaliados neste estudo incluíram estadiamento clínico, tipo histológico, tamanho do tumor e envolvimento do linfonodo por metástases (Tabela 2). A avaliação conjunta destas características clínico-patológicas é essencial para o entendimento do comportamento biológico do câncer de mama, tanto na mulher (FITZGIBBONS *et al.*, 2000) quanto na cadela (PHILIBERT *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2009). Estes parâmetros fornecem valiosas informações para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica (ALLRED *et al.*, 1998).

Tabela 2- Características clínicas e patológicas de carcinomas mamários em cadelas, atendidas no período de março de 2014 a fevereiro de 2016 no HOSPMEV/UFBA Salvador - Ba

Parâmetros	TOTAL (n=90)	MCT (n=60)	MC (n=30)
Linfonodo-metástase			
	27,8% (25/90)	33,3% (20/60)	5,5% (05/30)
Tamanho			
3-5cm	27,8% (25/90)	25% (15/60)	33,3% (10/30)
>5cm	72,2% (65/90)	75% (45/60)	66,6% (20/30)
Estadiamento Clínico			
Estadio II	27,8% (25/90)	25% (15/60)	33,3% (10/30)
Estadio III	54,4% (49/90)	56,7% (34/60)	50% (15/30)
Estadio IV	13,3% (12/90)	15% (09/60)	10% (03/30)
Estadio V	4,4% (4/90)	3,3% (02/60)	6,6% (02/30)

No presente estudo observou-se que a resposta inflamatória associada aos carcinomas mamários da cadela foi predominantemente linfocitária e se caracterizou pela distribuição, em sua maioria, multifocal com intensidade moderada no grupo CMT e variando de moderada a intensa no grupo MC. Os linfócitos representaram

a população celular predominante, seguido dos macrófagos. Estes resultados corroboram resultados da literatura humana e veterinária, que relatam ser, dentre as células do sistema imune, o linfócito o tipo celular mais observado seguido dos macrófagos nos carcinomas mamários (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; MANTOVANI, 2010; HEYS *et al.*, 2012; VIEIRA-FILHO, 2015; CARVALHO *et al.*, 2014). A presença de células inflamatórias associada aos tumores humanos tem sido relacionada pela maioria dos pesquisadores a uma resposta imunológica ineficiente em evitar o desenvolvimento tumoral (SHEU *et al.*, 1999; MACHETTI *et al.*, 2006; MURRI *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2014). Existem evidências de que as células inflamatórias secretam fatores de crescimento que promovem o desenvolvimento tumoral, agindo diretamente sobre as células neoplásicas ou indiretamente via promoção da angiogênese (STEWART; HEPPNER, 1997; MURRI *et al.*, 2008; WHITESIDE, 2008;). Por outro lado, alguns estudos demonstram que a resposta linfocítica é responsável por conter o avanço do carcinoma mamário (BEN-BARUCH, 2003, DENARDO; COUSSEN, 2007).

6.2 IMUNOFENOTIPAGEM DO SANGUE PERIFÉRICO

No presente estudo foram avaliados alguns parâmetros da resposta imunológica antitumoral com achados relevantes quanto ao percentual de linfócitos no sangue periférico, apresentação suposta de antígenos, correlação da resposta imune com sobrevida e quimioterapia em cadelas com carcinomas mamários.

A imunofenotipagem do sangue periférico por citometria de fluxo, como estratégia de análise para linfócitos, revelou diferenças significativas relacionadas ao percentual de linfócitos T (CD3⁺), linfócitos B (CD21⁺), das subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺, razão CD4⁺/CD8⁺, bem como na frequência das células CD14⁺ e a intensidade média de fluorescência (IMF) do MHC I e MHC II em monócitos (células CD14⁺) entre os animais do grupo controle, MCT e MC (Figura 4 e 5)

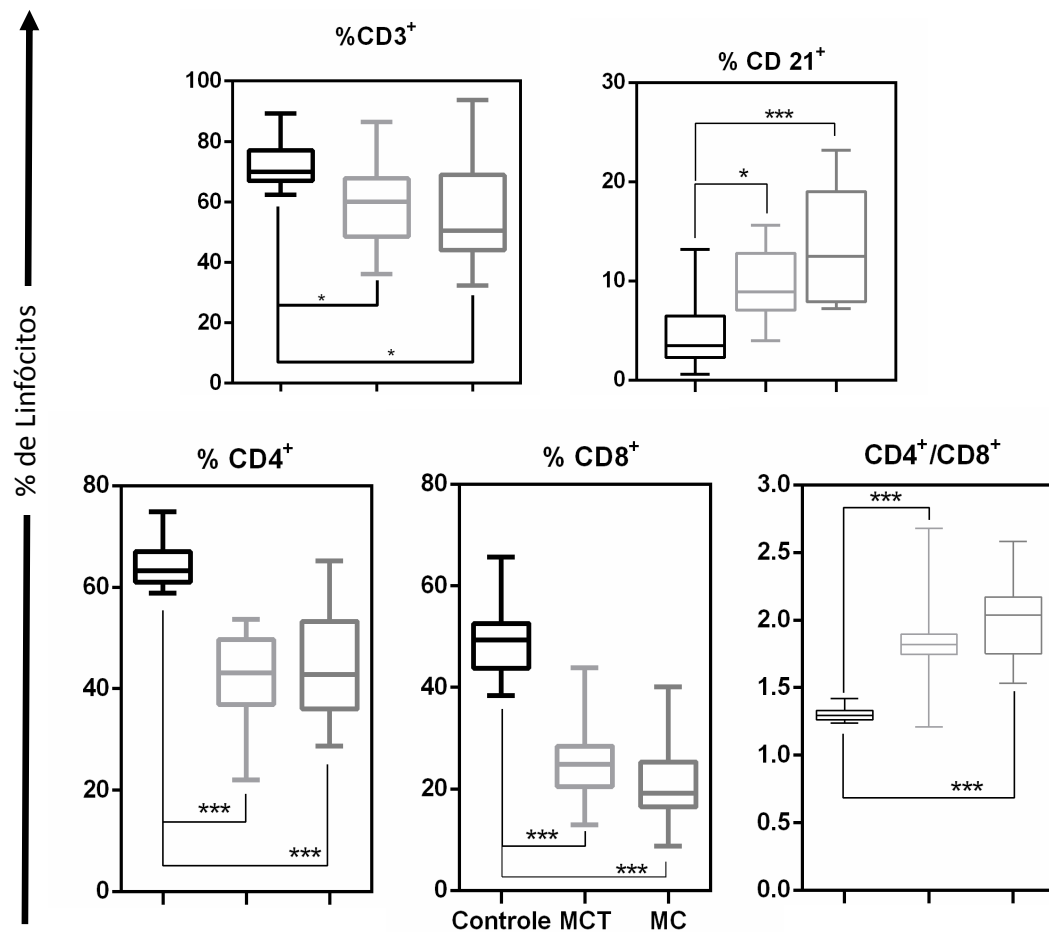


Figura 4 - Subpopulações de linfócitos no sangue periférico de cadelas com carcinomas mamários. A análise de dados foi realizada em cães saudáveis (controle), cadelas com carcinomas em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC). As análises imunofenotípicas foram realizadas por citometria de fluxo de três cores. Os linfócitos totais foram selecionados pela primeira vez com base em seu tamanho (dispersão a laser-frente-FSC) e granulosidade (dispersão lateral do laser-SSC) e subconjuntos analisados por estatísticas do quadrante em FL1 / FITC, FL2 / R-PE e FL3 / PE-Cy-5 dots plots. Os resultados são mostrados no formato do gráfico de caixa mostrando valores de linfócitos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺. Diferenças significativas, detectadas pela Análise de Variância, representada por um asterisco quando $p < 0,05$, por dois asteriscos para $p < 0,01$ e $p < 0,001$ são indicados por três asteriscos.

Estudos indicam que cães saudáveis apresentam em média, 16% de linfócitos no sangue periférico e destes até 70% e 21% são linfócitos T e B, respectivamente. O número de células T é reduzido no sangue periférico de pacientes com câncer de mama,

especialmente em formas localmente avançado e metastático (MURTA *et al.*, 2000). No entanto, estudos de subpopulações de linfócitos T têm mostrado diferenças nas contagens de linfócitos T, dependendo do estágio do tumor (ICHIHARA *et al.*, 2003).

Os linfócitos T são os principais constituintes da resposta imune celular e, têm por objetivo reconhecer e destruir antígenos de microrganismos intracelulares e de células tumorais. As células T apresentam especificidade restrita para antígenos, reconhecendo apenas aqueles apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e que se expressam na superfície de outras células (SNYDER, 2009). O resultado de menor frequência de células T no sangue periférico, observado neste estudo, pode indicar que estas células estejam migrando para o sítio anatômico tumoral, bem como aos linfonodos satélites, teoricamente para exercerem suas funções inflamatórias e citotóxicas contra o tumor. Kim et al (2010), Carvalho et al (2011), Kim et al (2013) e Estrela-Lima et al., (2010) observaram infiltrado predominantemente linfocítico associado aos carcinomas mamários caninos. Este resultado também foi observado na análise morfológica do infiltrado inflamatório no presente estudo. Contudo, para Estrela-Lima et al. (2011) o menor percentual de linfócitos T no sangue, bem como o predomínio de linfócitos no infiltrado associado ao tumor, apesar de sugerir não garante uma resposta antitumoral, mediada por linfócitos, efetiva pois ainda devem ser considerados fatores como ativação, polarização, mecanismos de evasão, anergia, exaustão e ainda o equilíbrio entre as subpopulações (TCD4⁺ e TCD8⁺).

Células T CD4⁺ desempenham um papel decisivo no estabelecimento da resposta imune específica tumoral, pois podem mediar a partir da produção de diferentes citocinas, mecanismos efetores envolvidos no controle e progressão da infecção (KEMP *et al.*, 1999). Os linfócitos T auxiliares, que expressam moléculas CD4⁺ em sua superfície, reconhecem peptídeos antigênicos no contexto MHC II apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (FORMAN, 1984) e, uma vez ativados promovem conexões imunológicas entre eventos da imunidade humoral, via interação T/B, da imunidade celular inata (via fagócitos e APCs) e adaptativa (via células T CD8⁺) (JOHNSON, 2003).

A presença da fração linfocitária de CD4⁺ no sangue periférico foi significativamente menor no grupo MCT e MC, se comparado ao grupo controle (p=0,0009). Este resultado está em concordância com a afirmação de que pacientes

oncológicos apresentam menor disponibilidade de linfócitos T periféricos, o que acarreta mecanismos de defesa menos eficientes (CAMPBELL *et al.*, 2005; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2017). Transtornos com relação aos mecanismos de defesa acarreta uma maior progressão da patologia, tornando o curso da doença mais rápido, com consequente piora do prognóstico. Não houve diferença significativa entre o grupo MCT e MC, como também não houve diferença entre o grupo controle e MC.

No presente estudo, os resultados demonstraram uma diminuição no percentual de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico dos animais dos grupos experimentais (MCT e MC) em relação ao controle, em concordância com o que foi observado por Karayannopolou e colaboradores (2017), em cadelas portadoras de tumores mamários. Esta diminuição de T CD8⁺ sugere um maior recrutamento destas células para o microambiente tumoral e para os linfonodos satélites para realizar suas funções citotóxicas. Como a resposta antitumoral é mediada por células T citotóxicas, dependentes não somente de mediadores solúveis, como TNF, IFN- γ e FasL solúvel, mas também de contato célula-célula para exercer suas funções (MARTINS *et al.*, 2016). Contudo, aparentemente, essa possível migração pode não representar uma resposta antitumoral totalmente efetiva, haja vista, a evolução tumoral observada, em alguns casos. Estrela-Lima e colaboradores (2012) relataram o aumento da fração CD8⁺ no sangue periférico dos animais portadores de MCT, estadio I e sem presença de metástase. Para esses autores o maior percentual de linfócitos T CD8⁺ indica maior possibilidade de controle e estabilização da doença, sugerindo melhor prognóstico. Cabe ressaltar, que a comparação entre o estudo de Estrela-Lima *et al.* (2012) e o presente estudo, neste aspecto, não é pertinente diante dos diferentes perfis estudados (inclusão de estágio I e animais sem metástase) ainda que em grupo histológicos idênticos (MCT e MC).

Em cães hípidos o percentual do subtipo T CD4⁺ corresponde aproximadamente a 42% e T CD8⁺ a 28 % (FALDYNA *et al.*, 2001; FELSBURG, 2002; BLOUNT *et al.*, 2005). Animais com idade inferior a 12 meses apresentam um percentual maior de CD4⁺ em relação ao CD8⁺ e após esse período ocorre um declínio do CD4⁺ e aumento dos percentuais de CD8⁺ (FALDYNA *et al.*, 2001; FELSBURG, 2002).

Nesse microambiente inflamatório tumoral, a produção de citocinas linfoproliferativas, como IL-2, quimiotáticas (IL-6), inflamatórias (IFN- γ e TNF), ativam diversos tipos celulares, tais como células T CD4⁺ e células apresentadoras de antígenos,

tanto no tumor com nos linfonodos periféricos adjacentes ao sítio anatômico (HARRIS e DRAKE, 2013; BURKHOLDER *et al.*, 2014; KIM e CANTOR, 2014). Este fato poderia justificar a diminuição de células T CD4⁺ no sangue periférico de cadelas MCT e MC em relação ao controle. O desenvolvimento do processo inflamatório no sítio anatômico, devido ao infiltrado de células T CD8⁺, exercendo função citotóxica via perforina/granzimas e apoptótica, via trimerização de Fas e FasL, desencadeia destruição tecidual e maior chance de metástase, com maior liberação de antígenos tumorais solúveis. Esses antígenos solúveis, por sua vez, podem ser apresentados aos linfócitos B (células CD21⁺) propiciando a seleção e expansão clonal das mesmas, com produção de anticorpos antígeno-específicos (DiLILLO *et al.*, 2010).

A razão CD4⁺/CD8⁺ entre 1.5 a 2.0 está dentro do padrão para cães de até 12 meses e saudáveis (FELSBURG, 2002). No presente estudo observou-se uma elevação da razão CD4⁺/CD8⁺ nas cadelas dos grupos MC e MCT em comparação às cadelas do grupo controle ($p < 0,0001$). Este resultado ganha importância adicional, em se tratando de pacientes oncológicos, pois o aumento dessa razão, a priori sugere migração dos linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico para o tumor e linfonodos, com subsequente contribuição para o processo inflamatório e de destruição tecidual/tumoral. Entretanto, resultados diferentes têm sido observado (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2012) e ratificado no presente estudo, uma razão CD4⁺/CD8⁺ entre 1.8 e 1.9 apresenta relação com melhor prognóstico e maior sobrevida.

O percentual de linfócitos T está significativamente reduzido nos grupos MCT e MC em relação ao grupo controle. Enquanto, se observa o contrário em relação aos linfócitos B (CD 21⁺), ou seja, este tipo celular estava significativamente aumentado nos grupos MCT e MC em relação ao grupo controle ($p=0,0004$). Apesar da apresentação de antígenos particulados e parte dos antígenos solúveis serem apresentados nos linfonodos proximais, a necessidade da presença de linfócitos B nestes locais de apresentação antigênica não é rigorosa, o que explica a elevação da frequência de células B no sangue periférico das cadelas MCT e MC quando comparadas com os controles. Uma maior frequência de células B no sangue periférico pode indicar também uma maior concentração sérica de anticorpos tumor-específicos, elevando ainda mais a capacidade citotóxica de linfócitos T via ADCC (citotoxicidade mediada por anticorpo) contra o tumor em cadelas com MC e MCT (TSOU *et al.*, 2016).

Estudos demonstram que a ativação crônica da célula B contribui para o desenvolvimento tumoral, por inibir a atividade das células CD4⁺ por mecanismos ainda desconhecidos (QIN *et al.*, 1998). No entanto, a ativação aguda das células B possui um papel fundamental na eliminação precoce das células neoplásicas, a partir da secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas, participando da regressão dos tumores (WHITESIDE, 2008).

A despeito da resposta imune celular, importante para o controle da progressão da massa tumoral e destruição das células neoplásicas, as células apresentadoras de antígeno são de suma importância na resposta celular e humoral específicas, mediante a apresentação de antígenos intracelulares em moléculas de MHC I aos TCRs de linfócitos T CD8⁺ e antígenos particulados em moléculas MHC II aos linfócitos T (ABBAS *et al.*, 2012). No presente estudo, determinou-se também a frequência de células CD14⁺ (monócitos) no sangue periférico das cadelas. Células CD14⁺ podem ser direcionadas aos linfonodos proximais e após diferenciação em células dendríticas e macrófagos, exercerem a função de células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T (CHEN; MELLMAN, 2013; HARRIS; DRAKE, 2013; NARENDRA *et al.*, 2013). Os dados mostram uma elevação na frequência de monócitos no sangue de cadelas com MCT e MC em relação aos controles ($p < 0,0001$), demonstrando indiretamente, um maior potencial em apresentar antígenos nesses dois primeiros grupos (Figura 5).

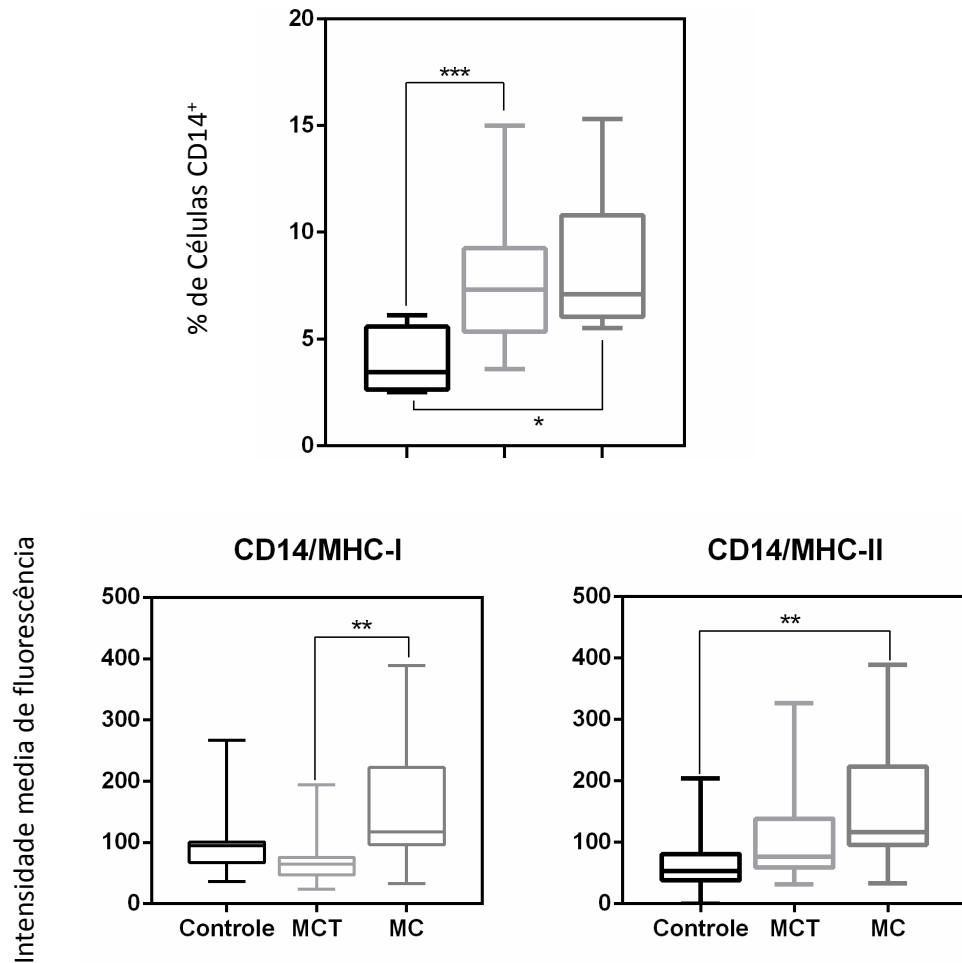


Figura 5 - Imunofenotipagem de sangue periférico de cadelas. Avaliação da frequência e índice médio de fluorescência de células CD14⁺ e expressão de receptores MHC I e MHC II. A análise de dados foi realizada em cadelas saudáveis (Controle) e cadelas com carcinomas em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC). As análises imunofenotípicas foram realizadas por citometria de fluxo de três cores. Os resultados são mostrados no formato do box plot apresentando valores de CD14⁺, IMF CD14⁺MHC I e IMF CD14⁺MHC II. Diferenças significativas, detectadas pela Análise de Variância, representada por um asterisco quando $p < 0,05$, por dois asteriscos para $p < 0,01$ e $p < 0,001$ são indicados por três asteriscos.

Além da maior frequência dos monócitos, demonstrou-se também uma maior expressão de moléculas de MHC I e MHC II em monócitos nos grupos com tumor, ressaltando a significativa elevação do MHC I, principalmente, no grupo MC, de maior malignidade e pior prognóstico. Os tumores que compõem este grupo, via de regra, apresentam crescimento rápido, extensas áreas de necrose, inflamação acentuada e lise

celular, com consequente liberação de antígenos específicos e inespecíficos, solúveis ou particulados, que são apresentados pelas células CD14⁺, via moléculas MHC I para as células CD8⁺. Este grande número de antígenos disponível pode causar exaustão das células citotóxicas, logo reduzida efetividade da resposta antitumoral (CRESPO et al., 2013).

Cabe ainda ressaltar que a regulação da expressão das moléculas MHC I e MHC II sofre a influência de determinadas citocinas (JOHNSON, 2003). Desta forma, em um microambiente tumoral rico em citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF- α , IL-6 e INF- γ , pode ocorrer maior expressão de moléculas MHC I e MHC II (WANG et al., 2008; MARTINS *et al.*, 2016), ou ainda, a depender do tipo de citocina produzido pelas células apresentadoras de antígenos observa-se uma polarização das células T (Treg, Th1, Th2 ou Th17) (BANERJEE et al., 2016). Contudo, a literatura demonstra com maior frequência a baixa expressão do MHC I e MHC II, em tumores mais agressivos caracterizando, possivelmente, um mecanismo de escape do tumor, tendo em vista que a expressão do MHC classe I pode ser sub-regulada pelas células tumorais (ESTRELA-LIMA et al., 2012).

A análise da fenotipagem das subpopulações de linfócito T (CD4⁺ e CD8⁺) realizada nos pacientes portadores de carcinoma em tumor misto Grau I e Grau II sem metástase regional teve por objetivo, verificar possíveis alterações nestas subpopulações que ajudassem a ratificar, diante da sua maior agressividade observada na rotina oncológica, a necessidade de prescrição de tratamento quimioterápico em cadelas do grupo MCT, com graduação histológica igual ou superior a II mesmo sem acometimento de linfonodos regionais. Para esta comparação foram avaliados 32 animais (16 portadores de tumor grau I e 16 de tumores Grau II). Quando se estratificou os casos de MCT quanto a graduação histológica, dividiu-se o grupo em dois subgrupos G1 (Grau I) e G2 (Grau II). A frequência de células T CD4⁺ no sangue periférico é maior nos casos G1 ($p < 0,001$) quando comparados com os casos G2, e o mesmo comportamento é observado com a frequência de células T CD8⁺ ($p = 0,01056$) (Figura 6). Em pacientes humanos, a reduzida frequência de linfócitos no sangue periférico foi relacionada por Murta e colaboradores (2000) com o avanço local ou metastático do tumor, como também relacionado por Ichihara e colaboradores (2003) a intensidade dessa frequência ao estágio de

desenvolvimento tumoral. Como anteriormente discutido, uma menor frequência de células T no sangue periférico pode indicar que estas células estejam migrando para o sítio anatômico tumoral, bem como aos linfonodos satélites, para exercerem suas funções inflamatórias e citotóxicas contra o tumor. Da mesma forma, nos casos G1, estas células estariam menos ativadas e menos direcionadas ao tumor, o que explicaria uma menor resposta inflamatória, menos metástase e conseqüentemente uma menor gravidade de doença.

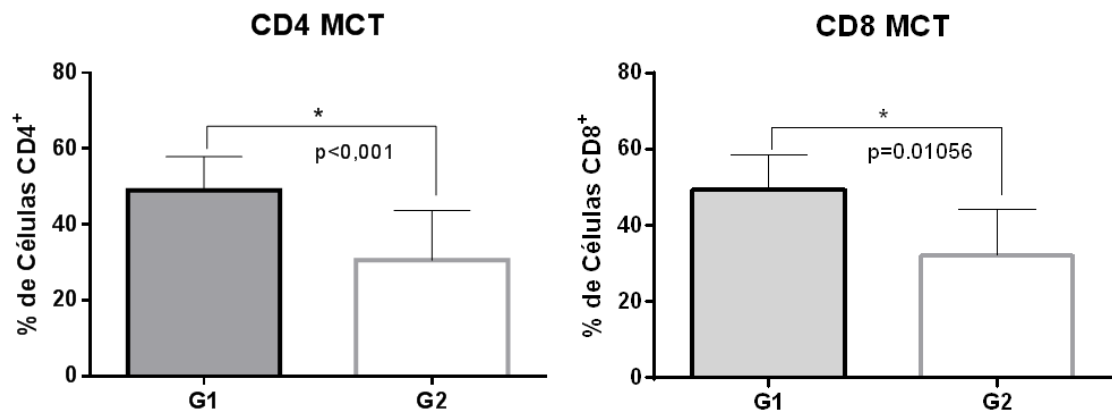


Figura 6 - Relação entre frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico e graduação histopatológica de cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT). Análise da relação entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do grupo MCT e a graduação histopatológica dos tumores, subdivididos em Grau 1(G1) e Grau 2 (G2). Diferenças significativas, reveladas durante o Test “t” Student, representadas por um asterisco* quando $p < 0,05$

6.3 BIOMARCADORES

Um critério bem estabelecido para a seleção de biomarcadores é a classificação de precisão, a partir dos índices de performance (STRIMBU; TAVEL, 2010; HENRY; HAYES, 2012). Estrela-Lima e colaboradores (2012), demonstraram que uma razão T CD4⁺/CD8⁺ maior ou igual a 1.8, em cadelas portadoras de carcinoma em tumor misto (MCT) e o IMF de MHC-I em monócitos maior ou igual a 100 possui relação com a maior risco de morte, conseqüentemente pior prognóstico e propuseram estes parâmetros como ferramentas alternativas no acompanhamento da evolução e sobrevivência em caninos com carcinoma de mama.

No presente estudo, a avaliação do desempenho destes parâmetros fenotípicos celulares propostos por Estrela-Lima *et al.* (2012), foi realizada, inicialmente em todas as cadelas, independente do grupo, e posteriormente ocorreu a segregação por grupo MCT e MC, com o objetivo de confirmar ou refutar o potencial dos biomarcadores razão CD4⁺/CD8⁺ e IMF de MHC-I em monócitos nos casos de carcinomas em tumor misto (CMT) e outros carcinomas (MC), respectivamente.

A análise dos dados, utilizando os pontos de corte indicados pela curva ROC de 1,88 e 105 para razão CD4⁺/CD8⁺ e expressão de MHC I por monócitos, respectivamente, observou-se correlação negativa significativa com as médias e taxas de sobrevivência nos respectivos grupos, ou seja, quanto maior a razão CD4⁺/CD8⁺ e os valores de IMF menor o tempo de sobrevivência (Figura 7 e 8). A análise da área sob a curva mostrou que tanto a razão CD4⁺/CD8⁺ quanto a expressão de MHC I por monócitos apresentaram sensibilidade e especificidade elevada, com acurácia 0,90 a 0,99 e 0,86-0,99, respectivamente, segundo critérios estabelecidos pela Swets (1996). Cabe ressaltar que os valores de ponto de corte obtidos nessa pesquisa foram muito próximos dos obtidos por Estrela-Lima e colaboradores (2012), que anteriormente não detectaram uma boa acurácia para expressão de MHC I por monócitos, fato que pode ser creditado ao menor número de animais avaliados naquela ocasião.

Figura 7. Relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT). O valor da razão CD4⁺/CD8⁺ para prever a progressão da doença para a sobrevivência ou a morte em cães do sexo feminino com MCT foi avaliada usando vários índices de desempenho, incluindo segregação em gráficos de dispersão, índices de curva de desempenho de ROC usando um corte específico, incluindo: Área Sob a Curva / segurança global (AUC), Co-positividade (Co-pos), Co-negatividade (Coneg).

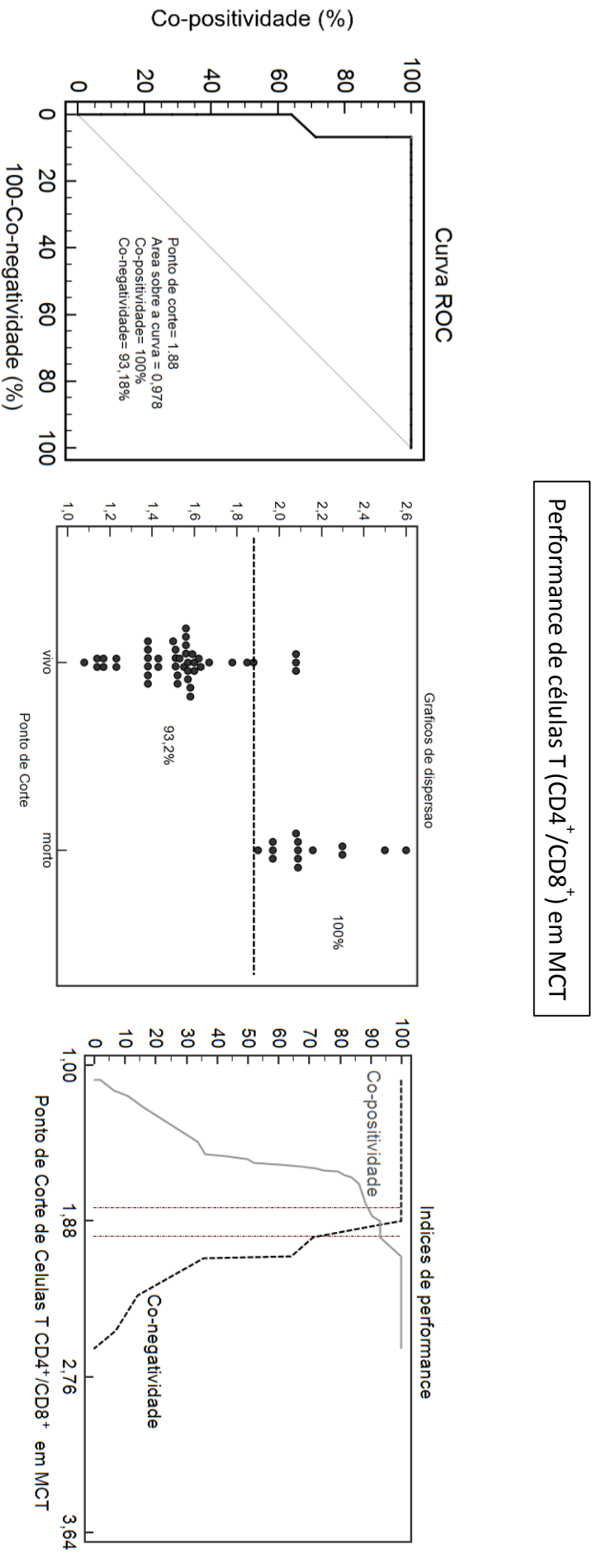
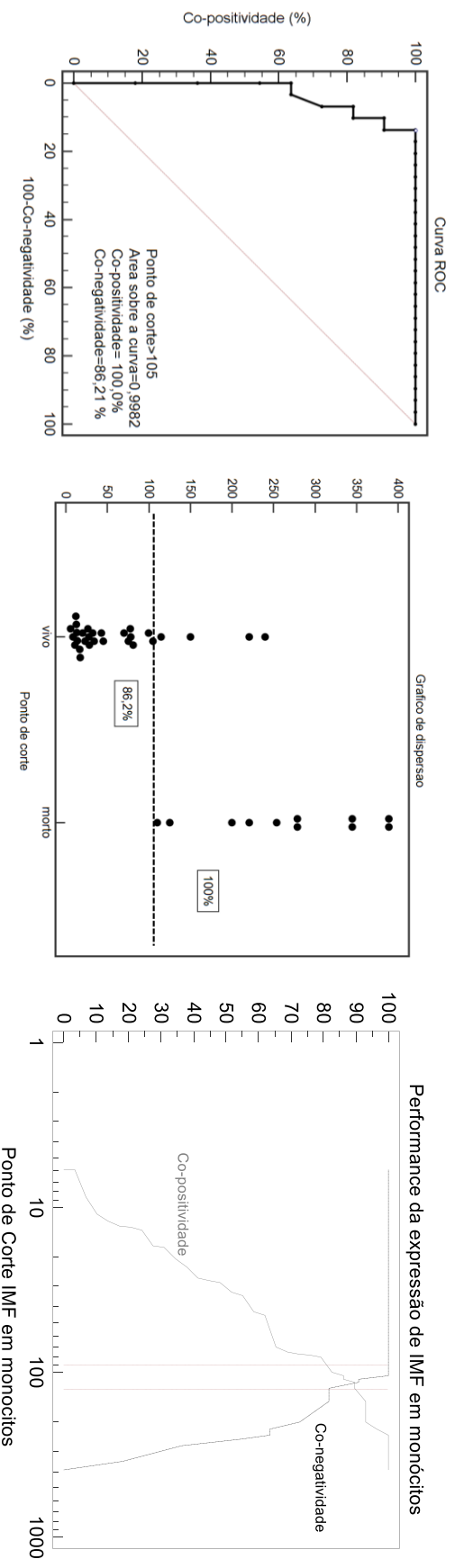


Figura 8. Relação IMF de CD14/MHC-I no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em cadelas com tumor misto (MCT). O valor da razão IMF MHC-I/CD14 para prever a progressão da doença para a sobrevivência ou a morte em cães do sexo feminino com MCT foi avaliada usando vários índices de desempenho, incluindo segregação em gráficos de dispersão, índices de curva de ROC usando um corte específico, incluindo: Área Sob a Curva / segurança global (AUC), Copositividade (Co-pos), Co-negatividade (Co-neg).

Performance da expressão de IMF em monócitos



A avaliação dos índices de desempenho para razão $CD4^+/CD8^+$ apresentou positividade (sensibilidade) de 100%, co-negatividade (especificidade) de 93,18% e valor preditivo negativo de 100%. Esses resultados mostraram que este parâmetro possui tanto sensibilidade quanto especificidade, indicando a sua capacidade de detectar quais cadelas portadoras de tumores mamários classificados como MCT possuem maior probabilidade de sobreviver.

Por sua vez, a avaliação dos índices de desempenho da expressão de MHC-I em monócitos mostrou co-positividade (sensibilidade) de 100%, co-negatividade (especificidade) de 86,21% e valor preditivo positivo de 100%. A análise dos dados mostrou que a expressão de MHC I por monócitos é um parâmetro altamente específico, indicando sua capacidade de detectar em cadelas com tumores mamários classificados histologicamente como MC cuja doença irá evoluir para a morte do animal.

Esses resultados suportam a proposta de análise das características fenotípicas de leucócitos circulantes como relevantes biomarcadores na rotina da clínica oncológica. Os parâmetros razão $CD4^+/CD8$ e expressão de MHC-I em monócitos possuem considerável sensibilidade e especificidade, respectivamente, e podem contribuir como biomarcadores prognóstico na exclusão de morte, ou seja, apresentam capacidade de detectar quais cadelas portadoras de MCT e MC apresentam maior probabilidade de sobreviver.

6.4 ANÁLISE UNIVARIADA E MULTIVARIADA

Quando correlacionados parâmetros clínico-patológicos foi observado, tanto na análise univariada quanto na multivariada, que a razão $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ ou $>1,8$ não possui associação significativa com o acometimento de linfonodos, estadiamento, tamanho do tumor, graduação histopatológica, sobrevida, quimioterapia e número de sessões de quimioterapia (Tabela 4). Contudo, na análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos associados a níveis de IMF ≤ 100 ou >100 , foi observada associação significativa com o acometimento de linfonodos, tamanho do tumor e sobrevida (Tabela 3 e 4). Este resultado é extremamente interessante pois indica que o biomarcador IMF

de MHC I em monócitos é um fator prognóstico independente, influenciando tanto isoladamente quanto em associação a outros fatores prognósticos clássicos, como tamanho tumoral metástase para linfonodos, na sobrevida dos pacientes.

Tabela 3 - Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos associados a razão de $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ ou $>1,8$.

Parâmetros	Valor de P (<i>Pvalue</i>)	
	Univariado	Multivariado
Linfonodo	0,792	<i>nd</i>
Estadiamento	0,733	<i>nd</i>
Tamanho	0,807	<i>nd</i>
Graduação	0,744	<i>nd</i>
Sobrevida	0,195	<i>nd</i>
Quimioterapia	0,792	<i>nd</i>
Número de Sessões	0,232	<i>nd</i>

* Selecionado para análise multivariada (Regressão Logística). O ponto de corte foi razão $CD4^+/CD8^+ \leq 1,8$ ou $>1,8$. Obs: *nd* = Não determinado.

Tabela 4 - Análise univariada e multivariada dos parâmetros clínicos associados ao $IMF \leq 100$ ou >100 .

Parâmetros	Valor de P (<i>Pvalue</i>)	
	Univariado	Multivariado
Linfonodo	0,046*	0,110
Estadiamento	0,162	<i>nd</i>
Tamanho	0,020*	0,034*
Graduação	0,207	<i>nd</i>
Sobrevida	0,010*	0,013*
Quimioterapia	0,205	<i>nd</i>
Número de Sessões	0,136	<i>nd</i>

* Selecionado para análise multivariada (Regressão Logística). O ponto de corte foi o $IMF \leq 100$ ou >100 . Obs: *nd* = Não determinado.

6.5 QUIMIOTERAPIA E COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE SOBREVIDA

O tempo mínimo de sobrevida foi de 32 dias atribuído ao animal do grupo MC, que evoluiu para óbito por metástase pulmonar após a mastectomia, e o máximo de 730 dias, atribuído a alguns animais dos grupos MCT e MC. Tipos histológicos mais agressivos como carcinomas sólidos, anaplásicos e micropapilar tem pior prognóstico, com a doença cursando de forma mais rápida (PÉREZ ALENZA *et al.*, 2003; CASSALI *et al.*, 2014; GOLDSMIDT *et al.*, 2017), o que justifica a menor sobrevida observada do grupo composto pelos demais tipos de carcinomas, de forma geral.

As curvas e a taxa de sobrevida estratificada com base nos animais não tratados e tratados, independentemente do tipo histológico, revelam diferenças significativas ($p = 0,0367$). Estas diferenças estatísticas persistem entre pacientes tratados e não tratados nos dois grupos histológicos e MC ($p = 0,0367$ e $p = 0,0164$) (Figura 9 e 10). As curvas de sobrevida demonstram que as cadelas tratadas com quimioterapia de ambos os grupos histológicos apresentam maior tempo de sobrevida global em relação as não tratadas (valores de mediana), sugerindo o benefício do tratamento com carboplatina as pacientes.

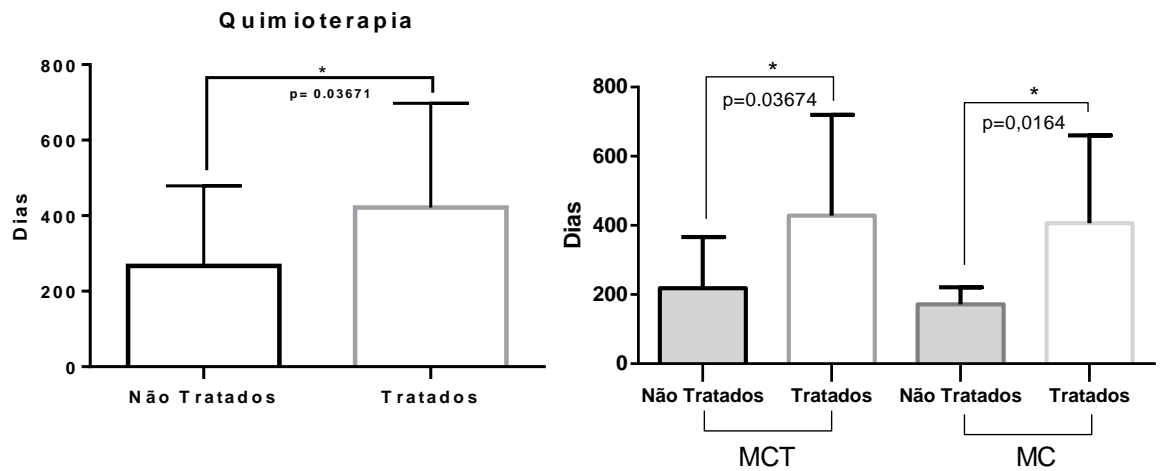


Figura 9 - Relação entre sobrevida e tratamento com quimioterapia em cadelas com carcinomas mamários. Análise da relação entre sobrevida e animais tratados ou não tratados. E análise de sobrevida e tratamento de cadelas com MCT e MC subdivididas em dois subgrupos tratadas e não tratadas. Diferenças significativas conferidas pelo Teste “t” de Student, quando $p < 0,05$, sendo indicadas por um asterisco*

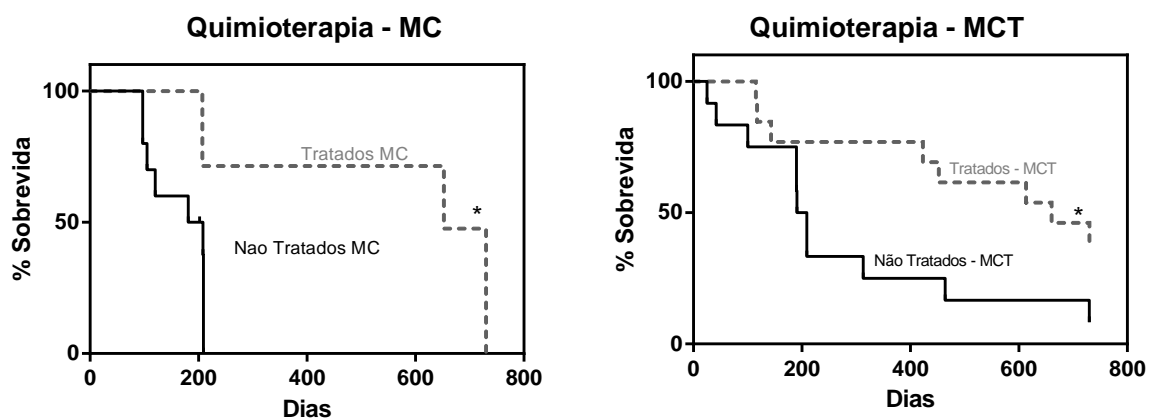


Figura 10. Taxas de sobrevida de animais com carcinoma mamário canino. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para animais com carcinoma em tumor misto (MCT) e carcinoma mamário (MC) subdivididos em dois grupos: tratados e não tratados. Diferenças significativas em $p < 0,05$ destacado por um asterisco.

A quimioterapia antineoplásica é indicada em pacientes que apresentam pior prognóstico, seja pelo tipo histológico agressivo, presença de invasão linfática/sanguínea ou metástase a distância (SORENMO, 2003; CASSALI *et al.*, 2014). O tratamento quimioterápico foi realizado em 32 cadelas (20 do grupo MCT e 12 do grupo MC) diagnosticadas com metástase regional ou com grau histológico II. A utilização do grau

histológico como fator prognóstico do câncer de mama tanto em cadelas quanto em mulheres já é bem estabelecido (CASSALI *et al.*, 2014). Este fator sabidamente apresenta correlação significativa com a agressividade tumoral, e conseqüentemente com menor sobrevida e pior prognóstico (DUTRA *et al.*, 2008; ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005; KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2001; NIETO *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2007). Contudo, este critério nem sempre é considerado relevante para conduta terapêutica da paciente. Cadelas com tumores diagnosticados com grau II sem manifestação de metástase em linfonodo regional são muitas vezes subtratados, podendo evoluir para o desenvolvimento de metástases e óbito.

Ocorre significativo acréscimo na taxa de sobrevida dos pacientes selecionados e submetidos ao tratamento quimioterápico, com base nos parâmetros estabelecidos pelos biomarcadores para cada grupo específico de carcinoma, sugerindo interessante potencial preditivo, principalmente evidenciado no grupo MC (Figura 11 e 12).

Razão de células T de CD4⁺/CD8⁺ e taxa de sobrevida

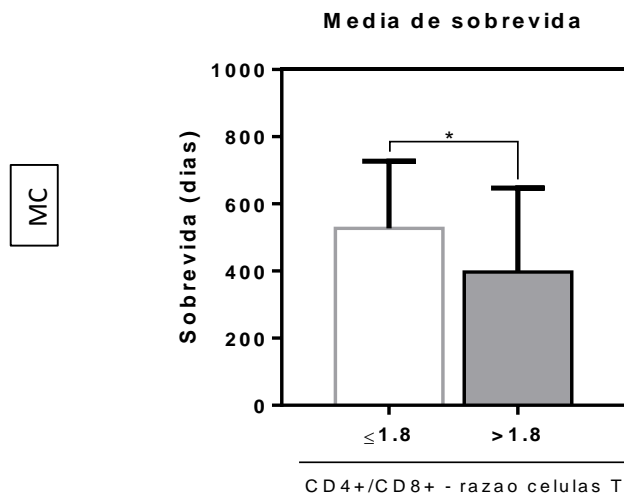


Figura 11. Relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT). Sobrevida média entre cadelas com MCT segregados em dois grupos com ponto de corte em 1.8. Os grupos foram comparados pelo Test “t” de Student, sendo representados por média ± erro padrão. Diferenças significativas em p<0,05 são indicadas por * asterisco

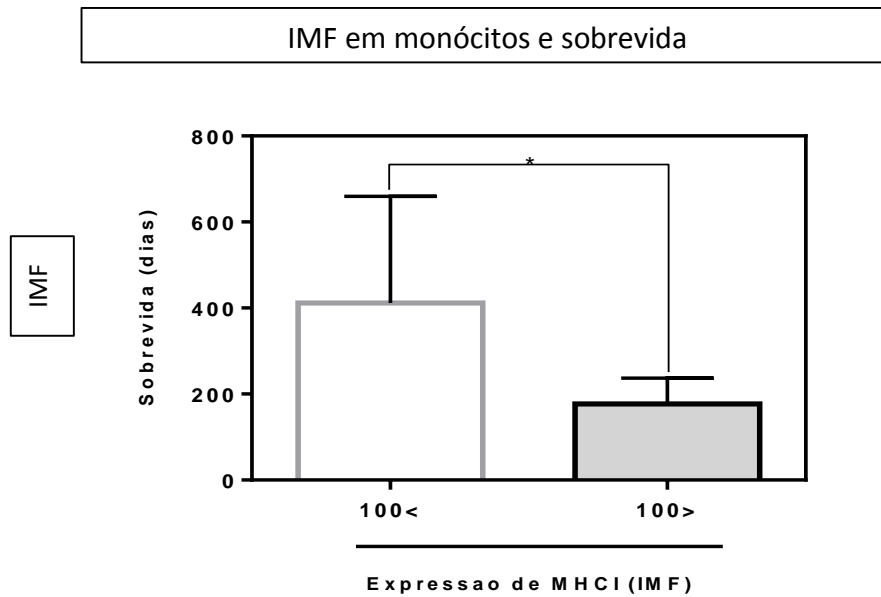


Figura 12. Relação IMF de MHC-I/CD14 no sangue periférico e sobrevida em cadelas com carcinoma em tumor misto (MCT). Sobrevida média entre cadelas com MCT segregados acordo com o IMF de /MHC-I/CD14. Os grupos foram comparados pelo Test “t” de Student, sendo representados por média \pm erro padrão. Diferenças significativas em $p < 0,05$ são indicadas por * asterisco.

Dentre os possíveis efeitos colaterais da quimioterapia, 9,4% (3/32) das cadelas apresentaram vômitos ou diarreia após a sessão. O tratamento completo preconizado neste estudo previa a realização de seis sessões de carboplatina, com intervalo de 21 dias. No grupo MCT, a maioria dos animais finalizou o tratamento, sendo o número mínimo de 4 e máximo de 6 sessões. Esses dados estão de acordo com o estudo de Lavallo e colaboradores (2011), em que o protocolo instituído previa 3 sessões de carboplatina. No grupo MCT, 50% (10/20) dos animais finalizaram o ciclo de quimioterapia e apresentaram-se vivos até o último contato, com sobrevida maior que 730 dias. Das outras dez cadelas que evoluíram para o óbito, seis apresentaram metástase (pulmão e pele), detectada entre a segunda e terceira sessão de quimioterapia nos exames de acompanhamento (clínico e de imagem), indicando evolução da doença. Vale a pena ressaltar que apesar do carcinoma em tumor misto representar um diagnóstico inicialmente mais favorável, os tumores destes pacientes apresentavam áreas carcinomatosas sólidas ou anaplásicas, indicando a importância de se avaliar o

subtipo/arranjo histológico associado ao MCT para uma indicação terapêutica mais apropriada. Essa evolução desfavorável está relacionada ao subtipo histológico com presença de áreas mais agressivas que, apesar de não alterar o seu estadiamento, influencia significativamente no seu prognóstico. A classificação histológica das neoplasias mamárias é a melhor ferramenta para a previsão do seu comportamento biológico (BENTUBO *et al.*, 2006).

Uma das pacientes do grupo MCT teve sua causa mortis associada aos efeitos colaterais da quimioterapia, que por si só, podem debilitar o paciente, ao ponto de impossibilitar a sua recuperação. Os efeitos colaterais mais observados foram vômitos e diarreia. A ocorrência de efeitos colaterais do trato gastrintestinal é citada por Gottesman (2002) e também por Rodaski e DeNardi (2004) como frequentes na utilização de carboplatina, assim como a imunossupressão, que pode ter sido subjugada pela ausência de sintomatologia clínica. Outras duas pacientes que finalizaram o tratamento apresentaram quadro de insuficiência renal e cardiopatia dilatada com tempo de sobrevivência de 423 e 452 dias após a mastectomia, respectivamente. A *causa mortis* destas cadelas não foi relacionada ao tratamento ou a evolução do processo neoplásico.

Alguns fatores podem estar relacionados com a evolução tumoral, o que sugere estudos mais aprofundados sobre o intervalo entre os ciclos de tratamento, a relação entre a droga utilizada e o tipo histológico a ser tratado, como também, a utilização de outras modalidades terapêuticas associadas a carboplatina ou a outros agentes antineoplásicos. (LANA *et al.*, 2007; DOMINGUEZ *et al.*, 2009). Os efeitos colaterais ao tratamento quimioterápico já são esperados e descritos na literatura (GOTTESMAN, 2002). Lavallo e colaboradores (2012) afirma que, em comparação com outras drogas, a carboplatina é bem tolerada, relatando mínimos efeitos colaterais.

No grupo MC dos 12 animais submetidos ao tratamento quimioterápico cinco finalizaram o tratamento, destes, quatro (30%) estavam vivos sem indícios de metástase no último contato, apresentando sobrevivência de 730 dias, intervalo máximo avaliado neste estudo. O quinto animal finalizou o tratamento quimioterápico com sucesso, mas evoluiu para o óbito 526 dias após última sessão com metástase disseminada para pulmão, pele, baço, fígado e rim. Mais sete animais evoluíram para o óbito, seis apresentaram metástase entre a primeira e a segunda sessão de quimioterapia e a taxa de sobrevivência variou de 32 a 125 dias. O oitavo caso de óbito observado no grupo MC não apresentou causa mortis

(traumatismo) relacionada a evolução tumoral ou aos efeitos colaterais do tratamento, sendo sua taxa de sobrevida 137 dias.

Cabe ressaltar que, em alguns animais que evoluíram para o óbito, durante grande parte dos acompanhamentos e até mesmo após a finalização destes, metástase pulmonar não havia sido identificada pelos exames tradicionais de imagem indicando a necessidade de utilização de técnicas diagnósticas por imagem mais sensíveis, reduzindo as discrepâncias entre estadiamento clínico e os achados de necropsias. A insuficiência respiratória representou a principal causa mortis relacionada à evolução tumoral, enquanto o choque hipovolêmico (diarreias e vômitos) representou a causa mortis relacionada possivelmente aos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos com este estudo, nas condições metodológicas empregadas, permitiram concluir:
- O percentual de linfócitos T, independente do grupo, é menor sugerindo migração dessas células para o sítio tumoral e linfonodos regionais;
- Linfócitos B foram predominantes no grupo de tumores mais agressivos, o que sugere a sua contribuição para o desenvolvimento tumoral, via resposta humoral sabidamente menos eficaz que a resposta celular;
- O percentual de células CD14⁺ (monócitos) no sangue periférico das cadelas demonstraram, indiretamente, um maior potencial na apresentação de antígenos, via células dendríticas e macrófagos;
- A expressão aumentada de moléculas de MHC I e MHC II em monócitos pode indicar um possível mecanismo de escape do tumor, a partir da maior expressão de antígenos, provenientes de um ambiente rico em citocinas pró-inflamatórias ou em situações de lise celular mais acentuada, que “confundiriam” o sistema imunológico;
- Os biomarcadores razão CD4⁺/CD8⁺ e a expressão do MHC I em monócitos possibilitou a segregação de cadelas com alta probabilidade de sobrevivência ou morte, indicando potencial prognóstico nos grupos específicos;
- Ocorre significativo acréscimo na taxa de sobrevivência dos pacientes selecionados e submetidos ao tratamento quimioterápico, com base nos parâmetros estabelecidos pelos biomarcadores sugerindo interessante potencial preditivo;

- Existe correlação inversa entre valor do IMF do MHC I em monócitos <100 e acometimento de linfonodos, tamanho do tumor e taxa de sobrevida, sendo, portanto, este parâmetro proposto, com base na análise multivariada, como fator prognóstico independente de sobrevida para cadelas com outros carcinomas;
- Cadelas portadoras de MCT Grau II, possuem menor percentual de células CD4⁺ e CD8⁺ e independente do status nodal devem ser encaminhadas para tratamento quimioterápico adjuvante;
- As cadelas tratadas com quimioterapia antineoplásica com carboplatina apresentaram acréscimo relevante na sobrevida. Contudo, o tratamento quimioterápico, em alguns casos, não foi capaz de debelar a doença, que evoluiu mesmo durante o tratamento ou progrediu em metástases multicêntricas tardias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemistry & pharmacology**., v. 72, n. 11, p. 1605-21, 2006.

ALEXANDER, K.; JOLY, H.; BLOND, L. *et al.* A comparison of computed tomography, computed radiography, and film-screen radiography for the detection of canine pulmonary nodules. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 53, n. 3, p. 258-265, 2012.

ALLRED, D.C.; HARVEY, J.M.; BERARDO, M.; CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern Pathology**, v. 11, n. 2, p. 155-168, 1998.

ALMAND, B.; CLARK, J.I.; NIKITINA, E.; VAN BEYNEN, J.; ENGLISH, N.R.; KNIGHT, S.C.; CARBONE, D.P.; GABRILOVICH, D.I. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. **Journal of immunology**., v. 166, n. 1, p. 678-89, 2001.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v.28 n.1, 2005.

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

APTSIAURI, N.; CABRERA, T.; GARCIA-LORA, A.; LOPEZ-NEVOT, M.A.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. MHC Class I Antigens and Immune Surveillance in Transformed Cells. **International Review of Cytology**, v. 256, p. 139-89, 2007.

ARAÚJO, M.R.; CAMPOS, L.C. FERREIRA, E. CASSALI G.D. Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v 29, p.1360–1367. 2015.

ARENAS, C.; PEÑA, L.; GRANADOS-SOLER, J. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. **The Veterinary record**. v. 179 n. 5; p.125, 2016.

BANERJEE, A.; BHATTACHARYA, P.; JOSHI, A. B.; ISMAIL, N.; DEY, R.; NAKHASI, H. L. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 2016.

BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J. M.; BRODBELT, D. C. The effect of neutering on the risk of urinary incontinence in bitches - a systematic review. **The Journal of small animal practice**. (4):198-204, 2012.

- BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumormicroenvironment interactions. **Breast Cancer Research**, v. 31, p. 31-36, 2003.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUNDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in Beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1999.
- BENTUBO, H.D.L.; SOBRAL, R.A.; UBUKATA, R.; HONDA, S.T.; XAVIER, J.G. Carcinoma inflamatório de mama em cadela: relato de caso. **Revista Clínica Veterinária**, n. 65, p. 40-44, 2006.
- BERTAGNOLLI AC, CASSALI GD, GENELHU MCLS, COSTA FA, OLIVEIRA JF; GONÇALVES PB. Immunohistochemical expression of p63 and DeltaNp63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. **Veterinary Pathology**, 46:407-415. 2009.
- BERTAGNOLLI, A.C.; FERREIRA, E.; DIAS, E.J.; CASSALI, G.D. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian veterinary journal**. v. 89, n. 8, 312-7, 2011.
- BHARGAVA, R.; GERALD, W.L.; LI, A.R.; PAN, Q.; LAL, P.; LADANYI, M.; CHEN, B. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Modern pathology**., v. 18, n. 8, p. 1027-33, 2005.
- BILLER, B.J.; GUTH, A.; BURTON, J. H.; DOW, S.W. Decreased Ratio of CD8⁺ T Cells to Regulatory T Cells Associated with Decreased Survival in Dogs with Osteosarcoma. **Journal of veterinary internal medicine**. 24(5): 1118–1123. 2010.
- BOCARDI, M.; DABUS, D.M.M.; TENTRIN, T.C.; LIMA, G.S.; BARIANI, M.H. Influência hormonal na carcinogênese mamária em cadelas. **Revista científica eletrônica de Medicina veterinária**, ano VI, n. 11, 2008.
- BOSTOCK, D.E. Canine and feline mammary neoplasms. **British Veterinary Journal**, v. 142, p. 506-515, 1986.
- BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunicação em ciências da saúde**, v. 22, p.69-82, 2011.
- BURKHOLDER, B.; HUANG, R. Y.; BURGESS, R.; LUO, S.; JONES, V. S.; ZHANG, W.; LV, Z. Q.; GAO, C. Y.; WANG, B. L.; Zhang, Y. M.; HUANG, R. P. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta** 1845, 182–201, 2014.
- BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. **Progress In Experimental Tumor Research**, v.13, p. 1–27, 1970.
- CABRERA, T.; GARCIA-LORA, A.; LOPEZ-NEVOT, M.A.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. MHC Class I Antigens and Immune Surveillance in Transformed Cells. **International Review of Cytology**, v. 256, p. 139-189, 2007.
- CALDAS, S.A.; MIRANDA, I.C.; BRITO, M.F.; NOGUEIRA, V.A.; CID, G.C.; COSTA, S.Z.R.; FRANÇA, T.N.; PINTO, L.F. Aspectos clínico-patológicos das neoplasias mamárias em cadelas (Canis familiaris)*. **Revista brasileira de medicina veterinária**., v. 38, n. 2, p. 81-85, 2016.

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

CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. T-Lymphocytic Infiltrate in Canine Mammary Tumours: Clinic and Prognostic Implications. **In Vivo**. v. 25, p. 963-970, 2011.

CARVALHO, M.I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F.L. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. **BioMed research international**, 2014.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B.F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

CASSALI, G.D. Comparative mammary oncology: canine model. **BMC Proceedings**, v. 7, n. 1, 2013.

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

CASSALI, G.D.; GÄRTNER, F.; VIEIRA DA SILVA, M.J.; SCHMITT, F.C. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. v. 51, p. 307-10, 1999.

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

CASSU, R.N.; LUNA, S.P.L.; CLARK, R.M.O.; KRONKA, S.N. Electroacupuncture analgesia in dogs: is there a difference between uni- and bi-lateral stimulation? **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 25, p. 52-61, 2008.

CASSU, R.N.; SILVA, D.A.; GENARI FILHO, T.; STEVANIN, H. Electroanalgesia for the postoperative control pain in dogs. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 1, 2012.

CASTELLANO, M.C.; IDIART J.R. 1994. Carcinoma mamario inflamatorio em la perra. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 4, p. 244-248, 1994.

CAVALCANTI, M.F. **Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: Estadiamento TNM e Sistema de**

Nottingham. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 105f. 2006.

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

CHEN, D. S.; MELLMAN, J. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**. v. 39, n. 1, p. 1-10. 2013.

CHEUNG, K.L.; GRAVES, C.R.L.; ROBERTSON, J.F.R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 26, p. 91-102, 2000.

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

CLEARY, M. P.; GROSSMAN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, v.0, n.0, p.1-12, 2010.

COCKERELL, G.L.; SLAUSON, D.O. Patterns of lymphoid infiltrate in the canine cutaneous histiocytoma. **Journal of comparative pathology**., v. 89, n. 2, 193-203, 1979.

CONCEIÇÃO, A. M. S. **Fatores relacionados a supressão da resposta imunológica antitumoral em cadelas portadoras de carcinoma inflamatório mamário.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2017

CRESPO, J.; SUN, H.; WELLING, T. H.; TIAN, Z.; ZOU, W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 214–221, 2013.

CRESPO, M.I.; ZACCA, E.R.; NÚÑEZ, N.G.; RANOCCHIA, R.P.; MACCIONI, M.; MALETTO, B.A.; PISTORESI-PALENCIA, M.C.; MORÓN, G.; TLR7 triggering with polyuridylic acid promotes cross-presentation in CD8 α + conventional dendritic cells by enhancing antigen preservation and MHC class I antigen permanence on the dendritic cell surface. **Journal of immunology**. v. 190, n. 3, p. 948-60, 2013.

CURIGLIANO, G. Immunity and autoimmunity: revising the concepts of response to breast cancer. **Breast.**, v. 20, n. 3, p. 71-4, 2011

D'ASSIS, M. J. M., SILVA, L. P., MACHADO, M. C. A., NASCIMENTO, N. A., DAMASCENO, K. A., CASSALI, G. D. ESTRELA-LIMA, A. Pleomorphic lobular carcinoma breast in female dog subjected to chemotherapy with carboplatin. Carcinoma lobular pleomórfico de mama em cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 38(Supl.1): 139-146, 2016.

DAMASCENO, K A.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; GAMBA, C.O.; MIRANDA, F.F.; ALVES, M.R.; ROCHA, R.M.; DE BARROS, A.L.B.; CASSALI, G.D. HER-2 and EGFR mRNA Expression and Its Relationship with Versican in Malignant Matrix-Producing Tumors of the Canine Mammary Gland. **Plos One**, v. 11, n. 8, 2016a.

DAMASCENO, K.A.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; BOSCO, Y.O.; SILVA, L.P.; BARROS, A.L.B.; BERTAGNOLLI, A.C.; CASSALI, G.D. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. **Histology and histopathology**, v. 31, p. 675-688, 2016b

DAMASCENO, K.A.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, L.G.R.; RABELO, B.S.; CAMPOS, C.B.; BARROS, A.L.B.; CASSALI, G.D. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 195, 2012.

DENARDO, D.G.; COUSSENS, L.M. Review Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2007.

DILILLO, D. J.; YANABA, K. TEDDER, T. F. B Cells Are Required for Optimal CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. **Journal of Immunology**. 184(7):4006-4016, 2010.

DONAHUE, R.N.; MCLAUGHLIN, P.J.; ZAGON, I.S. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor-opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. **Exp Biol Med**, v. 236, n. 9, p. 1036-50, 2011.

DUTRA, A.P.; AZEVEDO JUNIOR, G.M.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1403-1412, 2008.

DUTRA, A.P.; GRANJA, N.V.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, p. 1673-81, 2004.

EHRlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung (in German). **Ned Tijdschr Geneeskde**; 5 (Pt 1):273–290. 1909.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 47(4):377-88, 2001.

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

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

ESPER, G.V. Z. **Estudo comparativo do emprego da eletroacupuntura e cloridrato de meperidina na analgesia de cadelas submetidas a castração cirúrgica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 95f, 2005.

ESTRELA-LIMA, A. **Caracterização da resposta inflamatória nos carcinomas mamários em cadelas**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S.; COSTA-NETO, J. M.; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; D'ASSIS, M. J. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research Treatment**, v.131, p.751–763, 2012.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Câncer**, v. 10, n. 256, 2010.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.S.; SOARES, R.P.; RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; COSTA, A.T.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; CASSALI, G.D. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 14, p. 88-100, 2013.
- EZERSKYTE, A.; ZAMOKAS, G.; GRIGONIS, A.; JUODZIUKYNIENE, N. The retrospective analysis of mammary tumors in dogs. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.53, n.75, p.3-8, 2011.
- FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs - A flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1–2, p. 23–37, 2001.
- FELICIANO, M.A.R.; SILVA, A.S.; PEIXOTO, R.V. R.; GALERA, P.D.; VICENTE, W.R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1094-1100, 2012.
- FELSBURG, P. J. Overview of immune system development in the dog: comparison with humans. **Human & experimental toxicology**, v. 21, n. 9–10, p. 487–492, 2002.
- FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 7, p.1-6, 2009.
- FERREIRA, E.; BREGUNCI, G.C.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 105-109, 2003.
- FERRERO-POUS, M.; HACENE, C.; BOUCHET, V.; LE DOUSSAL, M.; TUBIANA-HULIN, F.; SPYRATOS. Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast câncer prognosis. **Clinical cancer research**, v. 6, n. 12, p. 4745-54, 2000.
- FINN, O.J. Cancer immunology. **New England journal of medicine.**, v. 358, n. 25, p. 2704-15, 2008
- FISHER, C.R.; GRAVES, K.H.; PARLOW, A.F.; SIMPSON, E.R. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., v. 95, p. 6965-6970, 1998.

FITZGIBBONS, P.L.; PAGE, D.L.; WEAVER, D.; THOR, A.D.; ALLRED, D.C.; CLARK, G.M.; RUBY, S.G.; O'MALLEY, F.; SIMPSON, J.F.; CONNOLLY, J.L.; HAYES, D.F.; EDGE, S.B.; LICHTER, A.; SCHNITT, S.J. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement, 1999. **Archives Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

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

FOSSUM, T, W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2ª Ed, São Paulo: Roca. 2005.

FRANZONI, M. S.; FERREIRA, T. M. M. R.; SALVADOR, R. C. L.; AMORIM, R. L.; SILVA, C M. L.; ROSA, V. A. Carcinoma mamário micropapilar metastático em cadela associado com sobrevida de 306 dias. **Investigação**, 16(1):67-70, 2017.

FURIAN M.; SANDEI, C. F. C. S.; ROCHA, E. J. N.; LOT, R. F. E. Estudos retrospectivo dos tumores mamários em caninos e felinos atendidos no Hospital Veterinário da FAMED entre 2003 a 2007. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, SP, n. 8, 2007.

GAKIYA, H.H.; SILVA, D.A.; GOMES, J.; STEVANIN, H.; CASSU, R.N *et al.* Electroacupuncture versus morphine for the postoperative control pain in dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 346-351, 2011.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F.C. Clinicopathologic features of mammary invasive micropapillary carcinoma (IMC) in dogs. **Veterinary pathology**, v. 45, p. 600-01, 2008.

GARRIDO F, RUIZ-CABELLO F. MHC expression on human tumors--its relevance for local tumor growth and metastasis. **Seminars in cancer biology**., v. 2, n. 1, p. 3-10, 1991.

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

GLOUSHANKOVA, N.A. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. **Biokhimiia**, v.73, p.742-750, 2008.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO R, ZAPPULLI V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**. 48(1):117-31, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, P.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, p. 518-552, 2017

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. **The Annual Review of Medicine**, n. 53, p. 615-627, 2002.

GRIECO, V.; RONDENA, M.; ROMUSSI, S.; STEFANELLO, D.; FINAZZI, M. Immunohistochemical characterization of the leucocytic infiltrate associated with canine seminomas. **Journal of comparative pathology**., v. 130, n. 4, p. 278-84, 2004.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; MCNEISH, I.; CHARLES, K.A.; KULBE, H.; THOMPSON, R.G.; ROBINSON, S.C.; BALKWILL, F.R. Re-educating" tumor-

associated macrophages by targeting NF-kappaB. **The Journal of experimental medicine.**, v. 205, n. 6, p. 1261-8, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, V. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HARRIS, T. J.; DRAKE, C. G. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**. v.1, p.12, 2013.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas.** Botucatu – SP Universidade Estadual Paulista, Faculdade de medicina Veterinária e zootecnia, 2004. 90p. Tese de Doutorado - Área de clínica Veterinária.

HEDLUND, C.S. **Cirurgias do Sistema Reprodutor.** Cirurgia de Pequenos Animais. 3ed. Mosby Elsevier, p.731-732, 2008

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

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Molecular Oncology**, v. 6, p. 140-146, 2012.

HERMO, G.A.; TURIC, E.; ANGELICO, D.; SCURSONI, A.M.; GOMEZ, D. E.; GOBELLO, C.; ALONSO, DF. Effect of adjuvant perioperative desmopressin in locally advanced canine mammary carcinoma and its relation to histologic grade. **Journal of the American Animal Hospital Association**. 47(1):21-7, 2011.

HEYS, S.D.; STEWART, K.N.; MCKENZIE, E. J. *et al.* Characterisation of tumour-infiltrating macrophages: impact on response and survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 135, n. 2, p. 539-48, 2012.

HUANG, Y.; PEPE, M.S.A. Parametric ROC model-based approach for evaluating the predictiveness of continuous markers in case–control studies. **Biometrics**, v. 65, p. 1133–1144, 2009.

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

IM, K.S.; KIM, I.H.; KIM, N.H.; LIM, H.Y.; KIM, J.H.; SUR, J.H. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 3, p. 366-372, 2013.

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

JOHNSON, D. R. Locus-specific constitutive and cytokine-induced HLA class I gene expression. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 170, n. 4, p. 1894–1902, 2003.

JONES, M.E.; THORBURN, A.W.; BRITT, K.L.; HEWITT, K.N.; WREFORD, N.G.; PROIETTO, J.; OZ, O.K.; LEURYI, B.J.; ROBERTSON, K.M.; YAO, S.; SIMPSON, E.R. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., v. 97, n. 23, p. 12735-12740, 2000.

JORDAN, V.C. Tamoxifen (ICI 46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 269-276, 2006.

KANDIOLER-ECKERSBERGER, D.; LUDWIG, C.; MARGARETHE RUDAS, M. *et al.* TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 50-56, 2000.

KARAYANNOPOULOU M, ANAGNOSTOU T, MARGARITI A, KOSTAKIS C, KRITSEPI-KONSTANTINOOU M, PSALLA D, SAVVAS I. Evaluation of blood T-lymphocyte subpopulations involved in host cellular immunity in dogs with mammary cancer. **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 186, p. 45-50, 2017

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Histological Grading and Prognosis in Dogs with Mammary Carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of comparative pathology**, v. 133, p. 246–252, 2005.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J. Vet. Med. A. Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*, v. 48, p. 85-96, 2001.

KARAYANNOPOULOU, M.; LAFIONIATIS, S. Recent advances on canine mammary cancer chemotherapy: A review of studies from 2000 to date. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 167, n. 7-8, p. 192-200, 2016.

KARAYANNOPOULOU, M.; LAKDRIMIDOU, E.; DESSIRIS, A. Some epidemiological aspects of canine mammary tumors treatment and prognosis. **European Journal of Companion Animal Practice**, v. 1, p. 41-47, 1990.

KIM, H. J.; CANTOR, H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. **Cancer immunology research**. 2(2):91-8. 2014.

KIM, J. H.; CHON, S. K.; IM, K. S.; KIM, N. H.; SUR, J. H. Correlation of tumorinfiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic and immunohistochemical morphometric study. **The Canadian Journal of Veterinary Research.**, v.77, p. 142-149, 2013.

KIM, J.H.; HUR, J.H.; LEE, S.M. *et al.* Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222-227, 2012.

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

KNOWLES, G.; O'NEIL, B.W. Campo MS. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol.*, v. 70, n. 12, p. 8451-8, 1996.

KRYCZEK, I.; BANERJEE, M.; CHENG, P.; VATAN, L.; SZELIGA, W.; WEI, S.; HUANG, E.; FINLAYSON, E.; SIMEONE, D.; WELLING, T.H.; CHANG, A.;

- COUKOS, G.; LIU, R.; ZOU, W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood.**, v. 114, n. 6, p. 1141-9, 2009.
- KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S.; Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in veterinary science**, v. 81, n. 2, p. 218-24. 2006.
- LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M., **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, p.619-636. 2007.
- LASALVIA-PRISCO, E.; GARCIA-GIRALT, E.; CUCCHI, S.; VÁZQUEZ, J.; LASALVIA-GALANTE, E.; GOLOMAR, W.; LARRAÑAGA, J. Advanced breast cancer: anti-progressive immunotherapy using a thermostable autologous hemoderivative. **Breast cancer research and treatment**, v. 100, n. 2, p. 149-60, 2006.
- LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L.; CASSALI, G. D. COX-2 expression in canine mammary carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Pathology**. v. 46, n. 6, p. 1275-80, 2009.
- LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C.; CASSALI, G. D. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**. v.26, p.375-380, 2012.
- LEE, M.W.; FUJIOKA, K. Naltrexone for the treatment of obesity: review and update. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 11, p. 1841-5, 2009.
- LEITE, C.A.V.G.; CALLADO, R.B.; RIBEIRO, R.A. Receptores tirosina-quinase : implicações terapêuticas no câncer. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 29, p. 130-42, 2012.
- LONDON, C.A.; GARDNER, H.L.; MATHIE, T.; STINGLE, N.; PORTELA, R.; PENNELL, M.L.; CLIFFORD, C.A.; ROSENBERG, M.P.; VAIL, D.M.; WILLIAMS, L.E.; CRONIN, K.L.; WILSON-ROBLES, H.; BORGATTI, A.; HENRY, C.J.; BAILEY, D.B.; LOCKE, J.; NORTHRUP, N.C.; CRAWFORD-JAKUBIAK, M.; GILL, V.L.; KLEIN, M.K.; RUSLANDER, D.M.; THAMM, D.H.; PHILLIPS, B.; POST, G. Impact of Toceranib/Piroxicam/Cyclophosphamide Maintenance Therapy on Outcome of Dogs with Appendicular Osteosarcoma following Amputation and Carboplatin Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.
- MACCHETTI, A.H.; MARANA, H.R.C.; SILVA, J.S.; ANDRADE, J.M.DE.; RIBEIRO-SILVA, A.; BIGHETTI, S. Tumor-infiltrating CD4⁺ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. **Clinics.**, v. 61, n. 3, p. 203-8, 2006.
- MACHADO, M.C.A. **Efeito de doses baixas de naltrexona sobre a qualidade de vida e sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas ao tratamento com carboplatina**. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2015.
- MARCONATO, L.; LORENZO, R.M.; ABRAMO, F.; RATTO, A.; ZINI, E. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumors in dogs. **Veterinary and comparative oncology**, v. 6, p. 90-101, 2008.

- MARINHO, V. F. Z.; METZ, K.; SHANCHES, F. S. F; *et al.* Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, p.203-207, 2008.
- MARTIN, F.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity? **Trends in molecular medicine.**, v. 18, n. 12, p. 742-9, 2012.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 38-42, 2002.
- MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.189-191, 2003.
- MARTINS, G.R.; GELALETI, G.B.; MOSCHETTA, M.G.; MASCHIO-SIGNORINI, L.B.; ZUCCARI, D.A. Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines Mediated by NF- κ B Factor as Prognostic Markers in Mammary Tumors. **Mediators of inflammation**. v. 2016, p.1-10, 2016
- MATKOWSKI, R.; GISTEREK, I.; HALON, A.; *et al.* The Prognostic Role of Tumor-infiltrating CD4 and CD8 T Lymphocytes in Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2445-2452, 2009.
- MELVOLD, R. W.; STICCA, R. P. Basic and tumor immunology: a review. **Surgical Oncology Clinics of North America**.v.16, p.711-735, 2007.
- MEULTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5th Edition: Wiley-Blackwell, p. 518-552, 2017.
- MIALOT, J.P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Editora: A Hora Veterinária. Cap. 11, p. 131-137, 1988.
- MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In **Tumors in Domestic Animals** 4th edition. Edited by: Meuten DJ. Iowa State: University of California; p. 575-606. 2002.
- MISDORP, W.; ELSE, W.; HELLM'EN, E.; LIPSCOMB, T.P. **Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat**. In Second Series. WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals. Volume 2. Washington, DC, AFIP; 1999.
- MOHME, M.; RIETHDORF, S.; PANTEL, K. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 14, n. 3, p. 155-167, 2016.
- MOHME, M.; RIETHDORF, S.; PANTEL, K. Circulating and disseminated tumour cells — mechanisms of immune surveillance and escape. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 3, p. 155-167, 2017.
- MORETTA, L.; BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; CANTONI, C.; PENDE, D.; MINGARI, M.C.; MORETTA, A. Human NK cells and their receptors. **Microbes and infection**, v. 4, n. 15, p. 1539-44, 2002.

- MORETTO, A.J.G.; CORRÊA, F.G. Radioterapia para carcinoma em animais domésticos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 11, n. 20, 2013.
- MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; *et al.* Effect of ovariectomy in bitches with mammary neoplasms. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 656-658, 1998.
- MORRISON, W.B. Inflammation and cancer: a comparative view. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 26, n. 1, p. 18-31, 2012.
- MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: _____ **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: University of California Press, p. 518-552, 1990.
- MURRI, A.M.; HILMY, M.; BELL, J.; WILSON, C.; MCNICOL, A.M.; LANNIGAN, A.; DOUGHTY, J.C.; MCMILLAN, D.C. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. **British Journal Cancer**, v. 99, n. 7, p. 1013-19, 2008.
- MURTA, E.F.C.; ANDRADE, J.M.; FALCÃO, R.P.; BIGHETTI. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. **Tumori**, v. 86, p. 403-407, 2000.
- NARENDRA, B. L.; REDDY, K. E.; SHANTIKUMAR, S.; RAMAKRISHNA, S. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**. v. 62, p.823-834, 2013.
- NEVES, A.P.; VARGAS, M.D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.
- NIETO, A.; PEREZ ALENZA, M.D.; DEL CASTILLO, N.; TABANERA, E.; CASTAÑO, M.; PEÑA, L. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, p. 260–268, 2003.
- NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 8, p. 107-109, 2003.
- NUNES V.A.; CHAUDON M.B.O.; FERREIRA M.L.G.; PLIEGO C.M.; ABÍLIO E.J.; CARVALHO E.Q. Uso da imunoterapia com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) na obtenção de margem cirúrgica contida nos tumores mamários em cães (*Canis familiaris*). **Revista de ciências da vida**. Seropédica, v. 31, n. 1, p. 15-25, 2011.
- OLIVEIRA FILHO J.C.; KOMMERS G.D.; MASUDA E.K.; MARQUES B.M.F.P.P.; FIGHERA R.A.; IRIGOYEN L.F.; BARROS C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 30:177-185. 2010.
- OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. I.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.
- OSTRAND-ROSENBERG, S.; SINHA, P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. **Journal of immunology**., v 182, n. 8, p. 4499-506, 2009.
- OTONI, C.C.; RAHAL, S.C.; VULCANO, L.C.; RIBEIRO, S.M.; HETTE, K.; GIORDANO, T.; DOICHE, D.P.; AMORIM, R.L. Survey radiography and

computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n 1, p. 20, 2010.

OWEN, L.N. A comparative study of canine and human breast cancer. **Investigative & cell pathology.**, v. 2, n. 4, p. 257-75, 1979

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

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

PEÑA, L.; ANDRÉS, P. J.; CLEMENTE, M. *et al.* Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective estudy with two-year follow-up: relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, v.50, p.94-105, 2012.

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

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

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W. E.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **The Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 17, p. 102-106, 2003.

PIRES, P.G.; ESTRELA-LIMA, A.; DAMASCENO, K. D.; RIBEIRO, L. G. R.; ALCANTARA, A.; COSTA, A. T. Dermatômiosite em cão sem raça definida. **36º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, 2009.

POGGI, A.; MUSSO, A.; DAPINO, I.; ZOCCHI, M. R. Mechanism of tumor escape from imune system: Role of mesenchymal cells. **Immunology Letters**. v.159, p.55-72, 2014.

PRESS, M. F.; BERNSTEIN, L.; THOMAS, P. A; *et al.* HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. **Journal of clinical oncology** 15(8):2894-904. 1997

QIN, Z.; RICHTER, G.; SCHULER, T.; IBE, S.; CAO, X.; BLANKENSTEIN, T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. **Nature Medicine**, v. 4, n. 5, p. 627-630, 1998.

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

RIBEIRO, L.G.R. **Carcinoma inflamatório de mama em cadela: caracterização da resposta inflamatória, clínicos e anatomohistopatológicos**. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 132-146, 2011.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: 307p. 2004.

RODASKI, S.; NARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 3. ed. São Paulo: Medvet Livros, 305 p, 2008.

RODASKI, S.; PIEKARZ, C. H. Epidemiologia e etiologia do câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, p. 1-22, 2009.

ROOT, M. V.; JONHSTON, S. D.; OLSON, P. N. The effect of prepuberal and postpuberal gonadectomy on radial physeal closure in male and female domestic cats. **Veterinary radiology & ultrasound**, v.38, p.42-47, 1997.

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

SAEKI, K.; ENDO, Y.; UCHIDA, K. *et al.* Significance of tumor-infiltrating immune cells in spontaneous canine mammary gland tumors: 140 cases. **The Journal of veterinary medical science**, v. 74, n. 2, p. 227-230, 2012.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **International immunology**., v. 21, n. 10, p. 1105-11, 2009.

SALMERI, K. R.; BLOOMBERG, M. S.; SCRUGGS, S. L.; SHILLE, V. Gonadectomy in immature dogs: effects on skeletal, physical, and behavioral development. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 7, p. 1193-203, 1991.

SANTOS, K. C.; REQUIÃO, L. G. T.; RIBEIRO, L. G. R.; D'ASSIS, M. J. M. H. VIEIRA-FILHO, C. H. C.; DAMASCENO, K. A. MOREIRA, E. L.T.; ESTRELA-LIMA, A. Quimioterapia convencional e metronômica no tratamento de cadela com carcinoma em tumor misto em estadio avançado - Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 38(Supl.1):131-138, 2016.

SANTOS, M.; MARCOS, R.; FAUSTINO, A.M.R. Histological study of canine mammary gland during the oestrouscycle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 146-154, 2010.

SCHAFFER, K.A.; KELLY, G.; SCHRADER, R.; GRIFFITH, W.C.; MUGGENBURG, B.A.; TIERNEY, L.A.; LECHNER, J.F.; JANOVITZ, E.B.; HAHN, F.F. A canine model of familial mammary gland neoplasia. **Veterinary pathology**, v. 35, p. 168–177, 1998.

SCHAROVSKY, O.G.; MATAR, P.; FLUCK, M. Z.; RICO, M. J.; RABINOVICH, G.A. From immune surveillance to tumor-immune escape: the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack. **Immunologia**. v.25, n.2, p. 101-114, 2006.

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

- SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R.; BECHARA, G.H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 1091-1099, 2001.
- SETHI, G.; SHANMUGAM, M.K.; RAMACHANDRAN, L.; KUMAR, A.P.; TERGAONKAR, V. Multifaceted link between cancer and inflammation. **Bioscience Reports**, v. 32, n. 1, p. 1-15, 2012.
- SHEU, B.C.; KUO, W.H.; CHEN, R.J.; HUANG, K.J.; CHOW, S.N. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in neoplastic progression and lymph node metastasis of human breast cancer. **The Breast**, v. 17, p. 604-610, 2008.
- SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.
- SIMON, D. *et al.* In vitro efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 11, p. 1825-30, 2001.s
- SIMON, D.; SCHOENROCK, D.; BAUMGÄRTNER, W. NOLTE, I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 20(5):1184-90. 2006.
- SIMPSON, E.R.; CLYNE, C.; RUBIN, G.; BOON, W.C.; ROBERTSON, K.; BRITT, K.; SPEED, C.; JONES, M. Aromatase--a brief overview. **Annual Review of Physiology**, v.64, p. 93-127, 2002.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.
- SORENMO, K.; SHOFER, F.; GOLDSCHMIDT, M. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 266-270, 2000.
- SOUZA, C. H. M.; TOLEDO-PIZA, E.; AMORIN, R. BARBOZA, A. TOBIAS, K. M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Canadian Veterinary Journal**. v.50, p.506–510, 2009.
- SOUZA, J. V. Marcadores mucinosos associados ao câncer. **Revista da Associação médica do Rio Grande do Sul**, v. 46, n. 1,2, p. 70- 83, 2002.
- SPANER, D; BAHOLO, A. B lymphocytes in cancer immunology. In: MEDIN, J.; Fowler, D. **Experimental and Applied Immunotherapy**, Springer, 2011.
- STEWART, T.H.M.; HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, v. 115, p. 141-153, 1997.
- STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are Biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**. 5(6): 463–466, 2010
- SWETS, J. A. **Signal Detection Theory and ROC Analysis in Psychology and Diagnostics**. Collected Papers. New Jersey: LEA, 1996.
- TAFFAREL, M.O.; FREITAS, P.M.C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9, 2009.

TANCHOT, C.; TERME, M.; PERE, H.; TRAN, T.; BENHAMOUDA, N.; STRIOGA, M.; BANISSI, C.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G.; TARTOUR, E. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. **Cancer Microenviron.**, v. 6, n. 2, p. 147-57, 2013.

TAVARES, W.L.; LAVALLE, G.E.; FIGUEIREDO, M.S.; SOUZA, A.G.; BERTAGNOLLI, A.C.; VIANA, F.A.; PAES, P.R.; CARNEIRO, R.A.; CAVALCANTI, G.A.; MELO, M.M.; CASSALI, G.D. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica.**, v. 52, n. 1, p. 67, 2010.

THOMAS, L. Discussion. In Cellular and Humoral Aspects the Hypersensitive States, **H.S. Lawrence, ed. Hoebersohn-Harper**, 529–532.1959.

THURÓCZY, J.; *et al.* Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. **Journal Comparative Pathology**, v. 137, p. 122-129, 2007.

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

TRAN, C. M.; MOORE, A. S.; FRIMBERGER, A. E. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 252- 262, 2014.

TSOU, P.; KATAYAMA, H.; OSTRIN, E. J.; HANASH, S. M. The emerging role of b cells in tumor immunity. **Cancer Research**, v. 76, n. 19, p. 5591–5601, 2016.

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

VARN, F. S. MULLINS, D. W.; ARIAS-PULIDO, H.; FIERING, S. CHENG, C. Adaptive immunity programmes in breast câncer. **Immunology**, v,150, 25–34, 2016.

VIEIRA-FILHO, C.H.C. **Avaliação do infiltrado macrofágico nos carcinomas mamários de cadelas e sua correlação com a taxa de sobrevida**. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2015.

WANG, H.; RUAN, Z.; WANG, Y.; HAN, J.; FU, X.; ZHAO, T.; YANG, D.; XU, W.; YANG, Z.; WANG, L.; CHEN, Y.; WU, Y. MHC class I chain-related molecules induced on monocytes by IFN- γ promote NK cell activation. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1548–1556, 2008.

WHEATE, N.J.; WALKER, S.; CRAIG, G.E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 35, p. 8113-27, 2010.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904–12, 2008

WILLETT, W. Diet and Cancer. **The Oncologist**, v.5, p. 393-404, 2000.

WU, S.; CHOU, F.; RAU, K. Clinical significance of a serum CA 15-3 surge and the usefulness of CA 15-3 kinetics in monitoring chemotherapy response in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 124, n. 3, p. 879-882, 2010.

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

YAQUB, S.; AANDAH, E.M. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. **Oncogenesis**, v. 15, p. 43–63, 2009.

YAZIJI, H.; GOLDSTEIN, L.C.; BARRY, T.S.; WERLING, R.; HWANG, H.; ELLIS, G.K.; GRALOW, J.R.; LIVINGSTON, R.B.; GOWN, A.M. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. **JAMA**, v. 291, n. 16, p. 1972-7, 2004.

YEON, J.Y.; SUH, Y J.; KIM, S.W. *et al.* Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. **Nutrition**, v. 27, p. 912-918, 2011.

ZAGON, I.S.; MCLAUGHLIN, P.J. Opioids and differentiation in human cancer cells. **Neuropeptides**, v. 39, n. 5, p. 495-505, 2005.

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

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

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia aprovou, na reunião de 31 de Março de 2013, o parecer referente ao protocolo nº 11/2013 e certifica que o projeto de ensino intitulado, **“Patologia Mamária Comparada: Imunofenotipagem de citocinas séricas e leucócitos infiltrantes no tumor e sua correlação com fatores prognósticos nos carcinomas mamários de cadelas tratadas com carboplatina”**, coordenado pela profa Alessandra Estrela da Silva Lima, está de acordo com os princípios de ética e bem-estar animal.

Salvador, 07 de Abril de 2015

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Aragão', written over a horizontal line.

Lúcio Leopoldo de Aragão da Silva
Coordenador CEUA/MEVZ-UFBA

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
 HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA PROF RENATO MEDEIROS



Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido

O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem o objetivo de informar ao responsável pelo paciente, quanto aos principais aspectos relacionados ao projeto ao qual o animal será submetido, complementando as informações prestadas pelo seu médico veterinário e pela equipe de profissionais do Projeto Mama do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Nome do projeto: Avaliação da eficácia da quimioterapia anti-neoplásica em cadelas portadoras de carcinomas de mama selecionadas a partir do perfil de leucócitos no sangue periférico

Nome dos Médicos Veterinários responsáveis pelo estudo: Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima, MV. Msc. Mário Jorge Melhor Heine D´Assis, MV. Msc. Marília Carneiro de Araújo Machado, MV. Msc. Carlos Humberto da Costa Vieira Filho, MV. Msc. Keidylânia da Costa Santos, MV. Michelle Neves Pereira e MV. Aline Conceição dos Santos

Propósito e objetivo do projeto

Tumores de mama em cadelas são os principais tumores observados na clínica de pequenos animais, sendo a taxa de malignidade extremamente variável, podendo alcançar mais de 90% dos casos, muitos dos quais já apresentam metástase linfática no momento do diagnóstico. A partir deste estudo clínico, objetivamos determinar os principais achados clínicos e conduta cirúrgica adequada; estabelecer o diagnóstico e graduação histopatológica das neoplasias, correlacionando com os fatores prognósticos; avaliar o potencial proliferativo dos tumores e a eficácia da cirurgia e quimioterapia (convencional e metronômica) no aumento da sobrevida global; utilização de ômega 3 para melhoria do sistema imunológico; além do uso de eletroacupuntura como tratamento adjuvante à cirurgia.

Anexo 3. Ficha para exame clínico de tumores mamários caninos

FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS

RG: _____ RG projeto: _____ Data: _____

Histo: _____ Cito: _____ Raio-X: _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Nome: _____ Espécie: _____ Raça: _____

Sexo: Macho Fêmea Pelagem: _____ Cor: _____

Idade: _____ Porte: Pequeno (até 35cm) Peso: _____

FC: _____ FR: _____ Médio (36-46cm) Condição corporal: Magro

Mucosas: _____ TPC: _____ Grande (acima 46cm) Normal

Alimentação: Ração Comida caseira Ração + Comida caseira Obeso

Ambiente: _____

Antecedentes genéticos: _____

Vacinação: Anti-rábica Sim Não Quando/Qual: _____

Outras Sim Não Quando/Qual: _____

Vermifugação: Sim Não Quando/Qual: _____

Doenças anteriores e atuais: _____

Tomando medicamento: Sim Não Qual/Tempo: _____

Anticoncepcional: Sim Não Quanto/Qual: _____ Última data: _____

Cio Regular: Sim Não Último (data): _____

Castrada: Sim Não Idade: _____

Pseudo-gestação: Regulares Intermitentes Não

Partos: Sim Não Quantos: _____ Último: _____

Aborto: Sim Não Quantos: _____ Último: _____

Já cruzou e não emprenhou: Sim Não

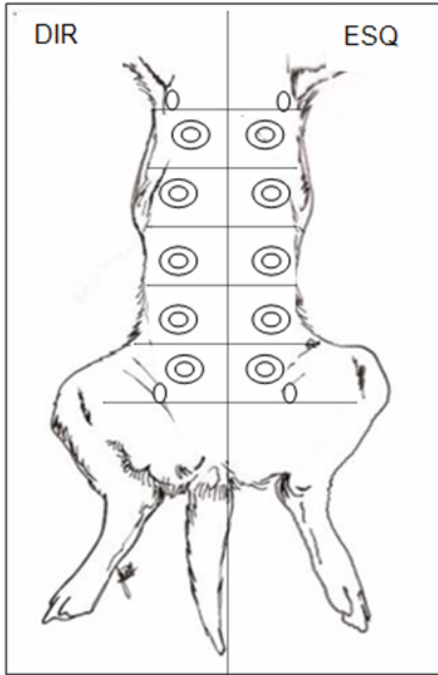
Secreção vaginal: Sim Não Quando/Intensidade: _____

Características do(s) tumor(s):

Inteira Ulcerada Cística

Mamas acometidas: (Esquema)

Exames solicitados:.....



Marcar com um X o tamanho correspondente:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Outro local:

Consistência:

Secreção: Sim Não

Edema de membros: Sim Qual(is)? Não

Linfonodos infartados: Sim Qual(is)? Não

Veterinário resp: Data: / /

Anexo 4. Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas de mama da cadela (modificado de OWEN, 1980)

Tumor Primário (T)

T0 Tumor não detectável

T1 Tumor < 3 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao Músculo

T2 Tumor de 3 – 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao músculo

T3 Tumor > 5 cm

a : não fixo

b : fixo à Pele

c : fixo ao músculo

T4 Tumor de qualquer tamanho

Linfonodos Regionais (N)

N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)

N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido

a : não fixo

b : fixo

N2 Linfonodos bilaterais envolvidos

a : não fixo

b : fixo

Metástases à Distância (M)

M0 Sem evidência de metástase distante

M1 Com metástase à distância

Agrupamento por estádios

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

T – Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase

(FONTE: Calvacanti e Cassali, 2006, modificado de Owen, 1980)

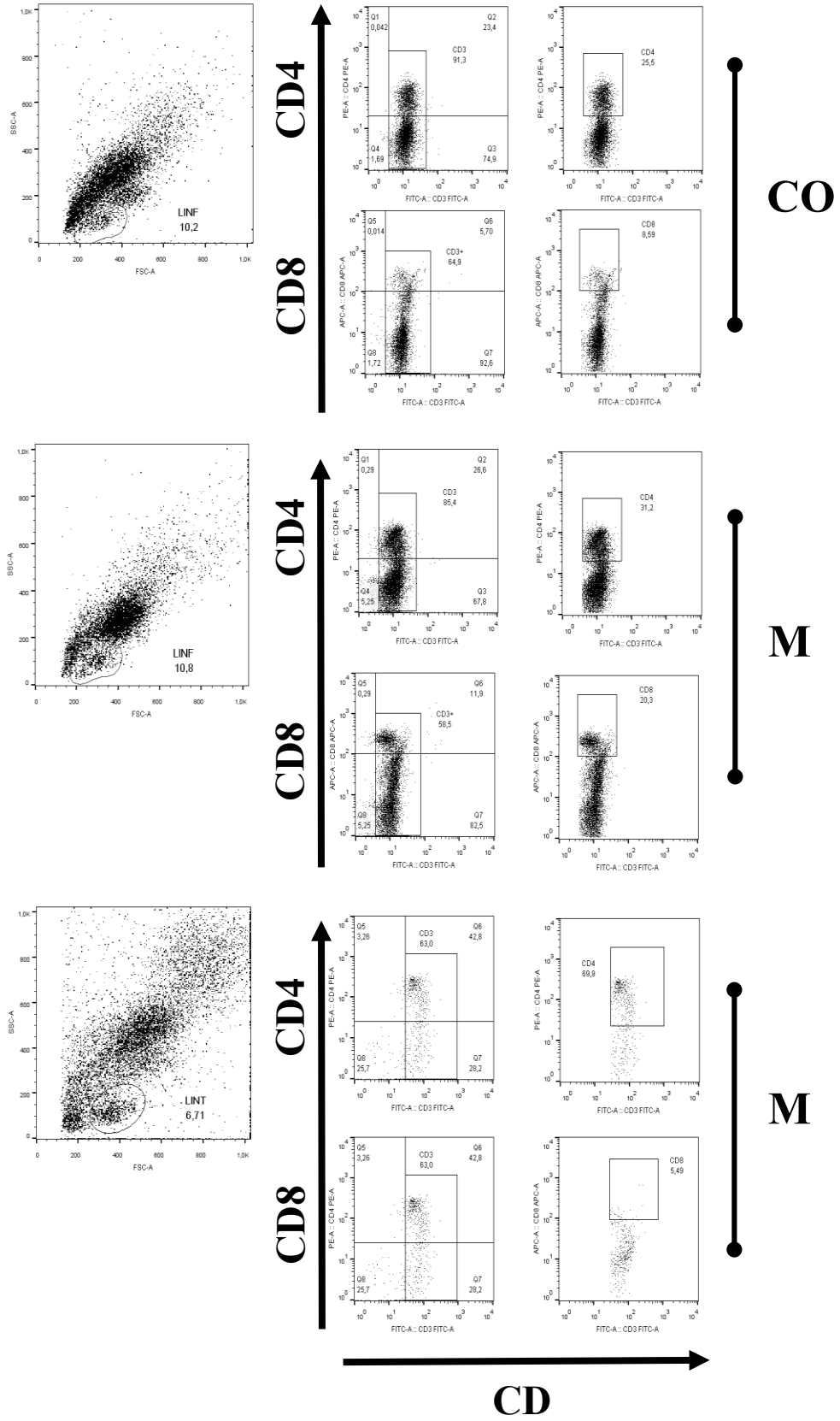
Anexo 5. Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade (FONTE: CAVALVANTI, 2006, modificado de ELSTON; ELLIS, 1993; CASSALI *et al.*, 2014).

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
< 10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante á célula normal	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Alocação do grau tumoral

Total de escore	Grau de malignidade
3 – 5	I
6 – 7	II
8 – 9	III

Anexo 6. Estratégia de obtenção e análise de dados de citometria de fluxo



Anexo 7. Termo de doação do corpo do animal - Laboratório de Patologia Veterinária (UFBA)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA
HOSPITAL DE MEDICINA VETERINÁRIA

500

TERMO DE DOAÇÃO

Pelo presente termo eu.....

R.G.nº.....,C.P.F.nº.....

endereço.....

faço doação a este Hospital Veterinário

de:.....raça.....sexo.....pelagem.....idade

.....para que esta Instituição utilize-o do modo que lhe aprouver, como seja: mantê-lo vivo para estudos, sacrificá-lo, inclusive doá-lo a pessoas ou Instituições.

Motivo da doação:

.....
.....
.....
.....

Salvador,de.....de 200...

Assinatura do doador

OBS: Anexar o Atestado de saúde animal, emitido pelo Médico Veterinário.

Anexo 8. Artigo publicado

Carcinoma lobular pleomórfico de mama em cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina - Relato de caso*

Mário Jorge Melhor Heine D'Assis¹, Laís Pereira Silva², Marília Carneiro de Araújo Machado³, Nara Araújo Nascimento⁴, Karine Araújo Damasceno⁵, Geovanni Dantas Cassali⁶ e Alessandra Estrela-Lima^{7*}

ABSTRACT. D'Assis M.J.M.H., Silva L.P., Machado M.C. de A., Nascimento N.A., Damasceno K.A., Cassali G.D. & Estrela-Lima A. [**Pleomorphic lobular carcinoma of the mammary gland in female dog subject to chemotherapy with carboplatin - Case report.**] Carcinoma lobular pleomórfico de mama em cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina - Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl.1):139-146, 2016. Programa de Pós-Graduação Ciência Animal nos Trópicos, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mail: alestrela@gmail.com

The objective of this report was present and discuss a Pleomorphic lobular carcinoma case incipient in canine female, 12 years old, Poodle, attended the Veterinary Medicine Hospital of the Federal University of Bahia (UFBA). For this, they were highlighted data relating to clinical, anatomical and histological, immunohistochemical and therapeutic. The final diagnosis was established by histopathological examination which revealed individual cells arranged in "single file", or dispersed in the stroma cells with sometimes bizarre and multinucleated, and intense nuclear pleomorphism and high rate mitotic. Immunohistochemical evaluation was performed to better characterize the tumor and aid in therapeutic management. The indicated treatment was chemotherapy with carboplatin, however there was progression of the disease and the animal died 54 days after surgery. This report describes at the first time the canine Pleomorphic lobular carcinoma in its initial stage, contributing to the understanding of the biological feature of this tumour.

KEY WORDS. Metastatic potential, survival, mammary tumor.

RESUMO. Objetivou-se a partir deste relato, apresentar e discutir um caso de Carcinoma lobular pleomórfico incipiente em fêmea canina, 12 anos, Poodle, atendida no Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Para tal,

foram ressaltados os dados referentes aos achados clínicos, anatomo-histopatológicos, imuno-histoquímicos e terapêuticos. O diagnóstico definitivo foi firmado pelo exame histopatológico que revelou células dispostas individualmente, com padrão linear,

*Recebido em 21 de março de 2015.

Aceito para publicação em 9 de maio de 2016.

¹ Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação Ciência Animal nos Trópicos (PPGCAT), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110. E-mail: mariojorgeh@uol.com.br - bolsista FAPESB.

² Médica-veterinária, Residente, Área Profissional de Saúde, subárea Cirurgia Veterinária, Hospital Veterinário Professor Renato Medeiros Netto, EMVZ, UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110. E-mail: laisvet@yahoo.com.br

³ Médica-veterinária, MSc. PPGCAT, EMVZ, UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110. E-mail: marilia.ufba@gmail.com - bolsista CAPES.

⁴ Médica-veterinária, Hospital Veterinário Dr. Vicente Borelli, Faculdade Pio Décimo, Av. Tancredo Neves, 5655, Jabotiana, Aracaju, SE 49094-970. Email: nara_med.vet@hotmail.com

⁵ Médica-veterinária, DSc. Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA 40296-710. E-mail: karajodamasceno@gmail.com

⁶ Médico-veterinário, DSc, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901. E-mail: cassalig@icb.ufmg.br

⁷ Médica-veterinária, DSc. PPGCAT, Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, EMVZ, UFBA, Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, BA 40170-110. *Autora para correspondência, E-mail: alestrela@gmail.com - bolsista CNPq.

dispostos em “fila indiana”, ou dispersos no estroma, com células por vezes bizarras e multinucleadas, além de intenso pleomorfismo nuclear e alto índice mitótico. Foi realizada a avaliação imuno-histoquímica para melhor caracterização do tumor e auxílio na conduta terapêutica. O tratamento indicado foi a quimioterapia com carboplatina, no entanto houve evolução do quadro clínico e o animal veio a óbito 54 dias após o procedimento cirúrgico. O presente relato descreve pela primeira vez o CLP em cadela no seu estágio inicial, contribuindo para o entendimento do caráter biológico desta neoplasia.

PALAVRAS-CHAVE. Potencial metastático, sobrevida, tumor de mama.

INTRODUÇÃO

Carcinoma lobular pleomórfico (CLP) é um tipo especial de neoplasia mamária maligna que corresponde a uma variante do carcinoma lobular invasor na mulher (Rosen & Oberman 1993, Rosen 1997, Rosen 2009). Na cadela, este tipo histopatológico foi descrito pela primeira vez em 2002, em um estudo que comparou os achados citomorfológicos e imuno-histoquímicos da neoplasia mamária na mulher, revelando similaridades entre as espécies (Cassali et al. 2002).

O CLP possui um comportamento clínico agressivo, apresentando prognóstico desfavorável e baixas taxas de sobrevida das pacientes acometidas. Uma importante característica, que comprova a sua alta capacidade de disseminação é a ausência da imunomarcagem membranar da E-caderina, molécula sabidamente relacionada à adesão entre células (Wahed et al. 2002).

Em virtude da escassez de casos relatados na literatura, não existe um tratamento padrão para o CLP, no entanto nos poucos relatos descritos, foi realizado o mesmo tratamento para pacientes com outros tipos de carcinoma de alto grau, observando o estadiamento clínico (Moe & Anderson 2005). Na espécie canina não foi descrito nenhum tratamento para este tipo de neoplasia (Cassali et al. 2002, Salgado et al. 2012).

Neste contexto, diante da escassez de dados na literatura consultada e do alto potencial de malignidade observado, objetivou-se, a partir do presente relato, apresentar e discutir um caso de CLP em fêmea canina, ressaltando os achados clínicos, anatomo-histopatológicos e imuno-histoquímicos.

HISTÓRICO

Uma cadela da raça Poodle, 12 anos de idade, não castrada foi atendida no setor de cirurgia de pequenos

animais do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com queixa principal de tumor de mama com evolução de seis meses. O proprietário relatou crescimento inicialmente lento, com evolução rápida e prurido intenso no último mês. Havia histórico de utilização prévia de progestágenos exógenos e episódios de pseudociese.

No exame clínico, foi observado bom estado corporal, mucosas normocoradas e constatados na mama quatro nódulos distintos, todos não aderidos, não ulcerados e de consistência firme, localizados: entre as mamas torácica caudal e abdominal cranial ($M_{2,3}D - 0,4 \times 0,3 \times 0,2\text{cm}$), entre as mamas abdominal caudal e abdominal cranial ($M_{3,4}D - 0,6 \times 0,3 \times 0,2\text{cm}$), na mama abdominal caudal ($M_4D - 0,5 \times 0,3 \times 0,2\text{cm}$) e na mama inguinal ($M_5D - 7,2 \times 6,7 \times 5,4\text{cm}$) (Figura 1A). A partir desta avaliação clínica, o animal encontrava-se em estadiamento clínico III (modificado de Owen, 1980).

Para avaliação pré-operatória completa, a cadela foi submetida a radiografia torácica e ultrassonografia abdominal para pesquisa de metástases, além de hemograma e perfil bioquímico sérico. Não foram identificadas imagens sugestivas de metástase pulmonar e os exames de avaliação geral não apresentaram alterações.

A cadela foi submetida a mastectomia radical unilateral (Figura 1B) com a retirada dos linfonodos inguinais. A cirurgia foi realizada sem intercorrências e a cadeia mamária, juntamente com o linfonodo inguinal direito, foram encaminhados para o exame histopatológico no Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV/UFBA (Figura 1B).

A avaliação macroscópica da cadeia mamária direita revelou que os nódulos localizados em $M_{2,3}D$, $M_{3,4}D$ e M_4D apresentavam superfície regular, consistência firme, não aderidos e não ulcerados. Ao corte, $M_{2,3}D$ era encapsulado com superfície compacta brancocenta. $M_{3,4}D$ e M_4D , também encapsulados, apresentaram superfície compacta de aspecto multilobular, brancocenta com áreas pardas. O maior nódulo localizava-se em M_5D e possuía $7,2 \times 6,7 \times 5,4\text{cm}$, superfície externa lisa, consistência variando de firme à flutuante, aderido à pele e não ulcerado, ao corte, deixava fluir moderada quantidade de líquido seroso amarronzado, superfície de aspecto multinodular, brancocenta, entremeada por áreas pardas a amarronzadas, por vezes avermelhadas.

Os fragmentos representativos dos nódulos mamários, incluindo pele e tecido subcutâneo além dos linfonodos regionais foram fixados em formol neutro, tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. As seções histológicas de $4\mu\text{m}$ foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (Luna 1968) e submetidas à avaliação histopatológica (diagnóstico e graduação).

Na avaliação microscópica do nódulo localizado em $M_{3,4}D$ foi evidenciada proliferação encapsulada de células epiteliais bem diferenciadas associada a reatividade de células mioepiteliais produtoras de cartilagem e índice mitótico baixo, firmando-se o diagnóstico de Tumor Misto Benigno. Em M_4D e M_5D , foi possível constatar lesões semelhantes caracterizadas por proliferação epi-

Carcinoma lobular pleomórfico de mama em cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina - Relato de caso

telial de células moderadamente pleomórficas, com aspecto carcinomatoso, associada à proliferação de células mioepiteliais bem diferenciadas, produtora de matriz mixóide com diferenciação em cartilagem e índice mitótico moderado, mas com algumas figuras atípicas. Havia ainda em M₅D intenso infiltrado inflamatório misto. A

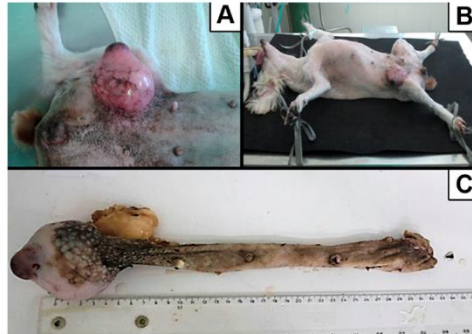


Figura 1. Canino, fêmea, exame clínico e cirurgia. A) Avaliação clínica da cadeia mamária; B) Animal preparado para procedimento cirúrgico; C) Cadeia mamária direita completa enviada ao LPV, contendo nódulos em M_{2,3}D, M_{3,4}D, M₄D, M₅D.

partir dessas características obteve-se o diagnóstico de Carcinoma em Tumor Misto (CTM) Grau II.

A análise das secções histológicas de M_{2,3}D revelou no parênquima mamário proliferação neoplásica infiltrativa para derme, composta por células de moderada a intensamente pleomórficas, individualizadas, dispostas em fileira ou em aglomerados. As células neoplásicas eram arredondadas a poligonais, com moderado citoplasma fortemente eosinofílico e marcada anisocariose. Presença de células bi ou trinucleadas e poucas mitoses visíveis. Com base nestes achados, obteve-se o diagnóstico de Carcinoma lobular pleomórfico (Figura 2 A, B e C). Os linfonodos inguinais apresentaram, na maior extensão do seu parênquima, discreta hiperplasia reacional e alterações circulatórias inespecíficas. Contudo, foram observadas células isoladas com aspecto epitelial sugestivo, compatível com micrometástase.

Com o objetivo de melhor caracterizar o CLP, secções histológicas foram encaminhadas para a análise imuno-histoquímica no Laboratório de Patologia Comparada ICB/UFMG. Os anticorpos primários utilizados foram: receptor de estrógeno (RE) (1D5, Dako, 1:50), receptor de progesterona (RP) (HPRA2, Neomarkers, 1:50), HER-2 (policlonal, Dako, 1:200), Ki-67 (MIB-1, Dako, 1:50), E-caderina (NCH-38, Dako, 1:60) e pancitoqueratina (CKAE1AE3, Dako, 1:100).

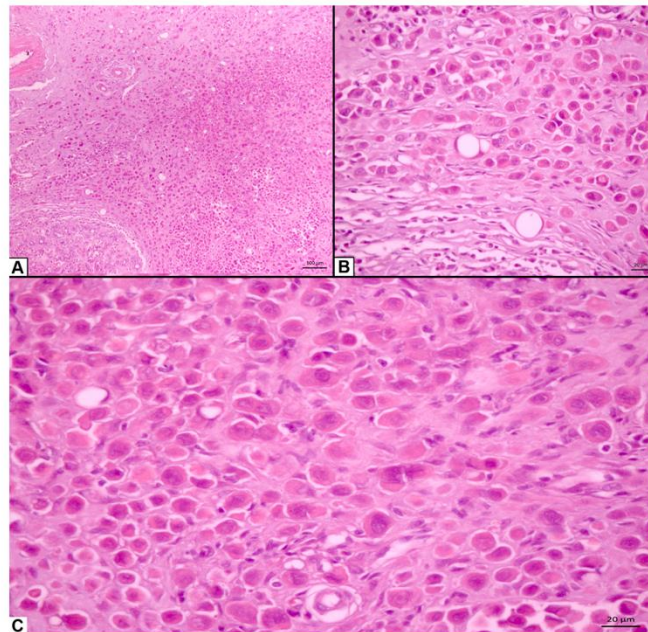


Figura 2. Fotomicrografia dos aspectos histopatológicos do carcinoma lobular pleomórfico mamário em cadela. A- proliferação neoplásica de células dispersas no estroma. Obj. 4X; B- Aspecto individualizado das células no carcinoma lobular pleomórfico, arranjo em fila indiana com mitose visível. Obj. 40X; C- Intenso pleomorfismo celular e nuclear, citoplasma abundante eosinofílico (aspecto apócrino), núcleo excêntrico e arranjo de células em fila indiana. Obj. 100X. HE

Mário Jorge Melhor Heine D'Assis et al.

O resultado da imuno-histoquímica revelou células isoladas em estroma adjacente a glândula mamária normal e hiperplásica com expressão citoplasmática forte de citoqueratina AE1/AE3, denotando origem epitelial (Figura 3A). A análise da expressão de E-caderina mostrou perda da expressão membranar desta molécula e forte expressão citoplasmática em células epiteliais neoplásicas invasoras (Figura 3B). Estas também apresentaram células epiteliais neoplásicas invasoras apresentando expressão nuclear positiva de receptor de estrógeno (pelo menos 5% das células) (Figura 3C) e de receptor de progesterona (em pelo menos 40% das células) (Figura 3D). Além disso, foram observadas expressão nuclear de KI-67 em aproximadamente 30% das células epiteliais

neoplásicas (Figura 3E) e marcação moderada a forte de HER-2 em membrana incompleta (escore 2 segundo ASCO/CAP 2013) (Wolff et al. 2013) (Figura 3F).

A partir do resultado histopatológico de acordo com Cassali et al. (2014) e da análise imuno-histoquímica foi iniciado o tratamento quimioterápico com carboplatina (300mg/m²). A paciente foi mantida em fluidoterapia com solução fisiológica quatro horas antes e quatro horas após a administração do quimioterápico, sendo aplicada ainda, por via subcutânea, metoclopramida (0,5 mg/kg), ranitidina (2mg/kg) e prometazina (0,1 mg/kg). Os mesmos medicamentos ainda foram prescritos, via oral, por três dias consecutivos.

Após 15 dias da sessão de quimioterapia o animal

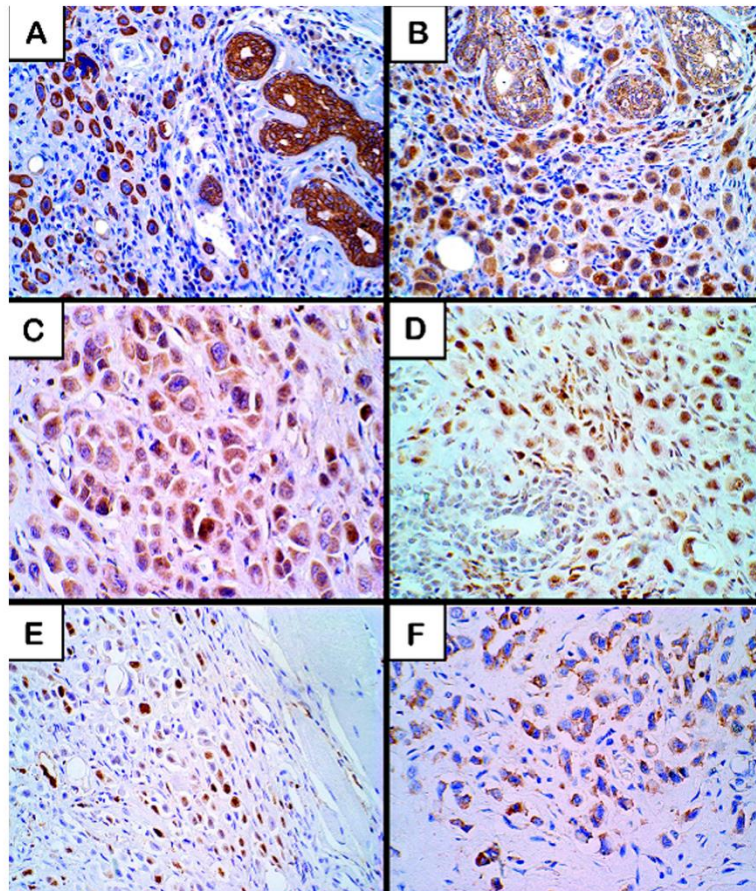


Figura 3. Canino, Carcinoma Lobular Pleomórfico, Fotomicroscopia da avaliação imunoistoquímica. A- Expressão citoplasmática forte de citoqueratina AE1/AE3, 400X; B- Expressão citoplasmática forte de E-caderina em células epiteliais invasoras, 400X; C- Expressão nuclear positiva de RE, 600X; D- Expressão nuclear positiva de RP, 600X; E- Expressão nuclear de KI-67, 400X; F- Marcação moderada a forte de HER 2, 600X.

Carcinoma lobular pleomórfico de mama em cadela submetida ao tratamento quimioterápico com carboplatina - Relato de caso

apresentou inapetência, êmese, diarreia e hipertermia, com piora progressiva do quadro clínico. Foi realizada terapia de suporte com fluidoterapia endovenosa e adicionado complexo B e glicose, com administração de dipirona sódica (25mg/kg), sendo prescrito ranitidina (2mg/kg), cloridrato de ondansetrona (0,2 mg/kg), dipirona sódica (25mg/kg), probiótico (2g/animal) e sulfametoxazol com trimetoprima (20 mg/kg).

Alguns dias depois, a paciente apresentou uma lesão de pele na região cervical ventral que se estendia até a região peitoral e aos membros torácicos, com presença de ulcerações e hematomas (Figura 4 A e B). Foi realizada a limpeza com solução fisiológica e administrado meloxicam (0,1mg/kg). Após três dias, a paciente mostrou agravamento do quadro clínico e, na auscultação pulmonar foi observada presença de estertor em região torácica. Foi instituída fluidoterapia com administração de cloridrato de tramadol (3 mg/kg) e furosemida (2 mg/kg), além de limpeza do local das ulcerações cutâneas com solução fisiológica e aplicação de pomada cicatrizante com cloranfenicol. Nesse período foram realizados hemogramas e bioquímicos seriados os quais revelaram anemia, leucopenia, trombocitopenia, além de aumento da creatinina. No entanto, após 54 dias do procedimento cirúrgico o paciente veio a óbito e seu corpo, com autorização da proprietária após assinatura do

termo de doação, foi encaminhado para exame necropsóptico no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UFBA.

Na necropsia, foram observadas mucosas intensamente hipocoradas e presença de duas áreas de ulceração na região ventral do tórax medindo 3,0 x 2,0 e 2,5 x 2,5 cm, acompanhadas por hematomas e edema (Figura 4 A e B). Além disso, foram detectados diversos nódulos cutâneos milimétricos dispersos por todo o corpo, os quais revelaram após avaliação histopatológica ser metástase cutânea da neoplasia diagnosticada como CTM. Com relação à cadeia mamária contralateral foram constatados dois nódulos sendo um localizado na mama abdominal caudal esquerda medindo 3,0 x 2,0 x 2,0 cm e o outro na mama inguinal esquerda medindo 1,0 x 0,8 x 0,8 cm, ambos de superfície regular, não ulcerados, não aderidos e de consistência firme.

Outros achados incluíram, na cavidade torácica, presença de aproximadamente 30 mL de conteúdo seroso levemente avermelhado (efusão pleural). Nos pulmões um nódulo em lobo diafragmático esquerdo medindo 0,5 x 0,5 x 0,4 cm, bem delimitado, coloração brancacenta e consistência firme (Figura 4C), ao corte, superfície compacta regular, encapsulada de coloração brancacenta. Na mucosa gástrica foram observadas três áreas de ulceração, localizadas na região da cárdia e recoberta

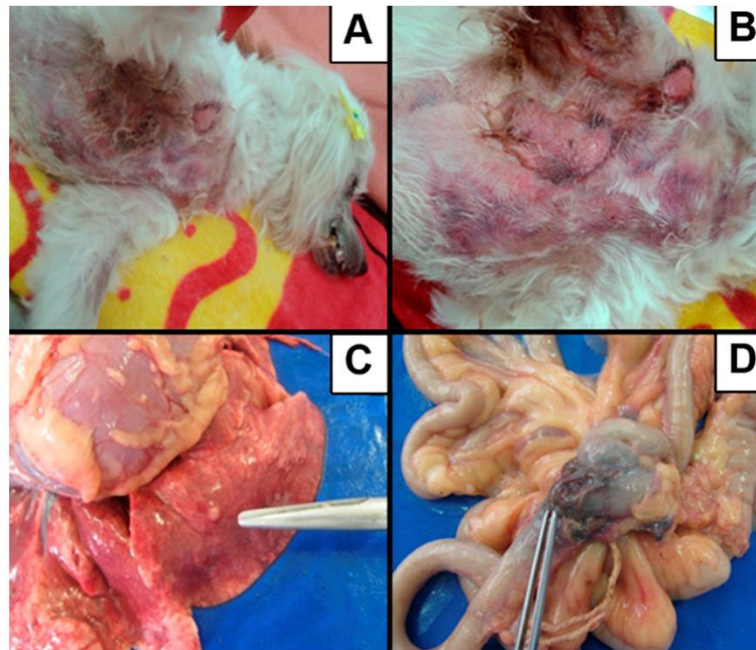


Figura 4. Canino, poodle, fêmea, 12 anos, Necropsia. A e B- Lesão em região cervical ventral que se estendia até a região peitoral e os membros torácicos, área edemaciada com presença de ulceração e hematomas; C- Nódulo em lobo diafragmático esquerdo medindo 0,5 x 0,5 x 0,4 cm, bem delimitado, coloração brancacenta; D- Região do duodeno com área de ruptura em evidência.

por conteúdo pastoso de coloração marrom escurecida e no intestino havia área de ruptura no duodeno (Figura 4D). Durante a necropsia, fragmentos das alterações em mama, pele, fígado, estômago e intestino foram colhidos e encaminhados para o exame histopatológico. A avaliação microscópica confirmou as suspeitas referentes às metástases para pulmão e pele, porém indicou tratar-se de metástases CTM Grau II, constatada pela presença de matriz mixóide associada as células epiteliais neoplásicas, previamente diagnosticado em M₁D e M₃D.

DISCUSSÃO

O presente relato possui expressiva relevância, pois apresenta, caracteriza e discute de forma pioneira o CLP em cadela, no seu estágio inicial, conduta clínica e tratamento instituídos. Neste caso, a lesão proliferativa foi observada em uma única mama, em forma de pequeno nódulo, por isso seu diagnóstico pode ser considerado um achado incidental e ratifica, diante da multiplicidade e heterogeneidade das lesões neoplásicas da mama, a necessidade da avaliação histopatológica de todos os nódulos presentes na cadeia mamária, independentemente do tamanho (Cassali et al. 2014).

O maior nódulo foi classificado como CTM, neoplasia atualmente mais frequente em cadelas (Bertagnolli et al. 2009, Estrela-Lima et al. 2010). Com base apenas no diagnóstico histopatológico, este tumor é menos agressivo e de melhor prognóstico. Contudo, quando avaliados o pleomorfismo celular, índice de formação tubular e contagem mitótica, fatores que compõem a graduação histopatológica (Elston & Ellis 1998), o CTM foi alocado no grau II, o que lhe conferiu maior potencial de malignidade.

A avaliação clínica da paciente foi realizada de acordo com o que preconiza a literatura, e as informações obtidas determinaram a conduta terapêutica e o estabelecimento do prognóstico (Cassali et al. 2014). Para isto, o sistema TNM foi a principal ferramenta utilizada e com base nele a cadela foi classificada inicialmente no estágio III, pois apresentava um nódulo maior do que 5cm e por não apresentar metástases em linfonodos regionais ou a distância no momento da avaliação clínica. No estadiamento patológico este animal passou para o estadiamento IV, pois foram observadas células neoplásicas em linfonodos regionais (Owen 1980). Esta evolução do quadro clínico evidencia a importância de uma intervenção precoce, uma vez que mesmo os casos que são considerados, teoricamente, menos agressivos, a exemplo dos CTM podem evoluir para piores prognósticos (Sorenmo 2003, Kristiansen et al. 2013).

O CLP foi observado em uma área delimitada da lâmina indicando sua fase inicial de desenvolvimento. As características microscópicas observadas nesse relato corroboram com os achados descritos na literatura veterinária e humana para o padrão apócrino do CLP, caracterizado por células tumorais intensamente pleomórficas, dispersas no estroma ou dispostas em um padrão linear (fila indiana), citoplasma eosinofílico relativamente abundante e núcleo excêntrico, além de alto índice mitótico (Cassali et al. 2002, Rosen 2009, Salgado et al. 2012, Rakha et al. 2013).

A análise imuno-histoquímica foi realizada com o objetivo de melhor caracterizar o CLP. O resultado desta avaliação mostrou expressão citoplasmática forte para citoqueratina (AE1/AE3) em células isoladas no estroma adjacente a glândula normal e hiperplásica, confirmando a origem epitelial. Foram detectadas também positividade para RE, RP, HER-2, além de expressão membranar para E-caderina em 30% de células para o marcador KI-67. Essas características estão em concordância com o que foi observado no presente caso juntamente com os dados relatados na literatura veterinária (Cassali et al. 2002, Salgado et al. 2012).

Na literatura humana existem dados conflitantes sobre a imunoexpressão dos receptores hormonais. No entanto, o CLP é conhecido por apresentar positividade para esses receptores, além de uma alta taxa de proliferação, representada pelo percentual de marcação do KI-67 (Rhadi 2000, Tavassoli & Devilee 2003). A expressão de E-caderina revelou marcação citoplasmática ao invés de um padrão membranar típico. Esses achados reforçam o alto potencial de disseminação do CLP e corroboram com achados prévios em carcinoma lobular em mulheres (Rhadi 2000, Tavassoli & Devilee 2003, Hanby & Hughes 2008), assim como em cadelas (Cassali et al. 2002, Salgado et al. 2012), onde a expressão deste marcador geralmente é negativa ou fraca na membrana de células carcinomatosas.

Na medicina humana não há um consenso sobre o tipo de tratamento ideal para o CLP, devido ao número reduzido de casos conhecidos e estágio avançado da doença (Jung et al. 2012, Blair et al. 2013, Khoury et al. 2014). No entanto, nos poucos relatos encontrados foi realizado o mesmo tratamento para pacientes com outros tipos de carcinoma de alto grau, com antraciclina e taxanos (Moe & Anderson 2005, Joh et al. 2012). No presente relato, apesar do estadiamento clínico não indicar a presença de metástase, foi instituído o tratamento quimioterápico, diante da graduação histopatológica.

gica do CTM, do estadiamento patológico e principalmente na tentativa de conter a agressividade do CLP, tumor de pior prognóstico ainda que incipiente. A escolha da carboplatina se justifica por ser essa a droga de eleição na medicina veterinária para neoplasias da glândula mamária com resultados satisfatórios (Lavalle et al. 2012).

Com a realização das sessões de quimioterapia busca-se promover de forma sequenciada e progressiva a destruição das células neoplásicas ou interrupção da sua proliferação. A paciente do presente relato foi submetida apenas a uma sessão de quimioterapia, devido à piora do quadro clínico e consequente óbito. Esta piora do quadro clínico foi observada aproximadamente dez dias após a aplicação do quimioterápico, sendo este tempo relacionado ao nadir da droga, ou seja, o tempo em que o animal pode apresentar valores hematológicos relacionados à anemia e imunossupressão. A conclusão da necropsia indicando como *causa mortis* choque misto (hipovolêmico e séptico) sugere a participação efetiva dos efeitos colaterais provenientes da quimioterapia com carboplatina, relacionados à mielossupressão, inapetência, vômito e diarreia, a exemplo do que foi observado por Siddik (1987) em estudos anteriores. Lavalle et al. (2009), em um estudo com um número maior de pacientes, não observaram efeitos colaterais significativos, consequentemente melhor qualidade de vida e maior sobrevida desses animais.

Como sítios mais frequentemente acometidos por metástases de neoplasias mamárias têm-se os linfonodos regionais, o pulmão e o fígado (Cassali et al. 2014). Podendo ocorrer, em alguns casos, a exemplo do que foi observado no presente relato, primeiramente no pulmão, posteriormente em linfonodos cervicais superficiais, externos ou inguinais profundos e/ou fígado, rins e, menos frequentemente, ossos, coração ou pele (Lana et al. 2007). Contudo, cabe ressaltar que tais focos metastáticos foram provenientes do CTM e não do CLP, como era esperado. Tal fato se deve, possivelmente, a fase inicial de desenvolvimento do CLP aqui relatado. Apesar do CTM ser considerado uma neoplasia de baixa agressividade, metástase para sistema nervoso central já foi observada na rotina veterinária (dados não publicados).

A sobrevida global, definida em dias como o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito pela doença, foi de 54 dias, considerada baixa, mas compatível com casos de CLP, sabidamente agressivos (Di Costanzo et al. 1990). Entretanto, com base nos achados de necropsia, a

causa mortis não apresentou relação com CLP. A neoplasia e as metástases, cutâneas e pulmonares detectadas, são provenientes do CTM cuja graduação histopatológica, fator prognóstico de grande importância, justifica seu maior potencial de malignidade.

CONCLUSÃO

Com base nos achados histopatológicos e imuno-histoquímicos, foi firmado o diagnóstico de CLP incipiente em cadela. Essa é uma neoplasia extremamente agressiva e considerada rara pela escassa literatura existente. Desta forma, o presente relato constitui uma importante contribuição, pois traz dados referentes ao comportamento clínico, conduta terapêutica e achados anatomo-histopatológicos do Carcinoma lobular pleomórfico em sua fase inicial.

REFERÊNCIAS

- Bertagnolli A.C., Cassali G.D., Genelhu M.C., Costa F.A., Oliveira J.F. & Gonçalves P.B. Immunohistochemical expression of p63 and Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression. *Veterinary Pathology*, 46:407-415, 2009.
- Blair S.L., Derek K.E., Kulkarni S., Shelley Hwang E., Malcarne V. & Ollila D.W. Breast Surgeon's Survey: no consensus for surgical treatment of pleomorphic lobular carcinoma *in situ*. *Breast Journal*, 19:116-118, 2013.
- Cassali G.D., Lavalle G.E., Ferreira E., Estrela-Lima A., Nardi A.B., Fernandes C.G., Sobral R.A., Amorim R.L., Oliveira L.O., Sueiro F.A.R., Beserra H.E.O., Bertagnolli A.C., Gamba C.O., Damasceno K.A., Campos C.B., Araujo M.R., Campos L.C., Monteiro L.N., Nunes F.C., Horta R.S., Reis D.C., Luvizoto M.C.R., Magalhães G.M., Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Tanaka N.M., Grandi F., Ubukata R., Batschinski K., Terra E.M., Salvador R.C.L., Jark P.C., Delecrodi J.E.R., Nascimento N.A., Silva D.N., Silva L.P., Ferreira K.C.R.S., Frehse M.S., Santis G.W., Silva E.O., Guim T.N., Kerr B., Cintra P.P., Silva F.B.F., Leite J.S., Mello M.F.V., Ferreira M.L.G., Fukumasu H., Salgado B.S. & Torres R. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 7:38-69, 2014.
- Cassali G.D., Gartner F. & Schmitt F.C. Pleomorphic lobular carcinoma of the canine mammary gland: histopathologic and immunohistochemical features. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54:592-594, 2002.
- Di Costanzo D., Rosen P.P., Gareen I., Franklin S. & Lesser M. Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of classical and variant tumors. *American Journal of Surgical Pathology*, 14:12-23, 1990.
- Elston C.W. & Ellis I.O. Assessment of histological grade, p.365-384. In: Elston C.W. & Ellis I.O. (Eds) *The Breast*. 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1998.
- Estrela-Lima A., Araujo M.S.S., Costa-Neto J.M.C., Teixeira-Carvalho A., Barrouin-Melo S.M., Cardoso S.V., Martins-Filho O.A., Serakides R. & Cassali G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, 10:256, 2010.
- Hanby A.M. & Hughes T.A. In situ and invasive lobular neoplasia of the breast. *Histopathology*, 52:58-66, 2008.
- Joh J.E., Esposito N.N., Kiluk J.V., Laronga C., Khakpour N., Soliman H. & Catherine Lee M. Pathologic tumor response of invasive

Mário Jorge Melhor Heine D'Assis et al.

- lobular carcinoma to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Journal*, 18:569-574, 2012.
- Jung S.P., Lee S.K., Kim S., Choi M.Y., Bae S.Y., Kim J., Kim M., Kil W.H., Cho E.Y., Choe J.H., Kim J.H., Kim J.S., Nam S.J. & Lee J.E. Invasive pleomorphic lobular carcinoma of the breast: clinicopathologic characteristics and prognosis compared with invasive ductal carcinoma. *Journal Breast Cancer*, 15:313-319, 2012.
- Khoury T., Karabakhtsian R.G., Mattson D., Yan L., Syriac S., Habib F., Liu S. & Desouki M.M. Pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast: clinicopathological review of 47 cases. *Histopathology*, 64:981-993, 2014.
- Kristiansen V.M., Nodtvedt A., Breen A.M., Langeland M., Teige J., Goldsmith M., Jonasdottir T.J., Grotmol T. & Sorenmo K. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with benign mammary tumors and hyperplastic lesions: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27:935-942, 2013.
- Lana S.E., Rutteman G.R. & Withrow S.J. Tumors of the mammary gland, p.619-636. In: Withrow S.J. & Vail D.M. (Eds), *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, 2007.
- Lavalle G.E., Bertagnolli A.C., Tavares W.L.F. & Cassali G.D. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology*, 46:1275-1280, 2009.
- Lavalle G.E., Campos C.B., Bertagnolli A.C. & Cassali G.D. Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. *In vivo*, 26:375-380, 2012.
- Luna L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw Hill, New York, 1968.
- Moe R.E. & Anderson B.O. Distinctive biology of pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Journal of Surgical Oncology*, 90:47-50, 2005.
- Owen L.N. *The TNM classification of tumors in domestic animals*. 1st ed. World Health Organization, Geneva, 1980. 53p.
- Rakha E.A., Van Deurzen C.H., Paish E.C., MacMillan R.D., Ellis I.O. & Lee A.H. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: is it a prognostically significant pathological subtype independent of histological grade? *Modern Pathology*, 26:496-501, 2013.
- Rhadi J.M. Immunohistochemical analysis of pleomorphic lobular carcinoma: higher expression of p53 and chromogranin and lower expression of ER and PgR. *Histopathology*, 36:156-160, 2000.
- Rosen P.P. & Oberman H.A. Tumors of the mammary gland. *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd ed. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, 1993.
- Rosen P.P. *Rosen's Breast Pathology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, p.489-491.
- Rosen P.P. Classical and pleomorphic lobular carcinoma cells, p.691. In: *Rosen's Breast Pathology*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009.
- Salgado B.S., Monteiro L.N., Colodel M.M., Figueiroa F.C., Nonogaki S., Rocha R.M. & Rocha N.S. Cytohistological and immunohistochemical features of a mammary invasive pleomorphic lobular carcinoma in a dog. *Comparative Clinical Pathology*, 21:495-499, 2012.
- Siddik Z.H., Boxall F.E. & Harrap K.R. Haematological toxicity of carboplatin in rats. *British Journal of Cancer*, 55:375-379, 1987.
- Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33:573-596, 2003.
- Tavassoli F.A. & Devilee P. Tumours of the breast. In: *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. IARC, Lyon, 2003.
- Wahed A., Connelly J. & Reese T. E-cadherin expression in pleomorphic lobular carcinoma: an aid to differentiation from ductal carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 6:349-351, 2002.
- Wolff A.C., Hammond M.E.H., Hicks D.G., Dowsett M., McShane L.M., Allison K.H., Allred D.C., Bartlett J.M.S., Bilous M., Fitzgibbons P., Hanna W., Jenkins R.B., Mangu P.B., Paik S., Perez E.A., Press M.F., Spears P.A., Vance G.H., Viale G. & Hayes D.F. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *American Society of Clinical Oncology/College of American*, 31:3997-4014, 2013.