

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE
INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM TUMORES
MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS CANINOS**

Carla Cristiane Fernandes
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Agosto de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE
INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM TUMORES
MAMÁRIOS CANINOS**

Carla Cristiane Fernandes
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F363c Fernandes, Carla Cristiane, 1985-
2012 Caracterização imuno-histoquímica de infiltrado inflamatório em
 tumores mamários espontâneos caninos / Carla Cristiane Fernandes
 . -- 2012.
 76 f. : il.

 Orientadora: Alessandra Aparecida Medeiros.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Câncer em cão - Teses. 3. Mamas - Câncer - Teses. 4. Imunohistoquímica - Teses. I. Medeiros, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carla Cristiane Fernandes – Nascida em 28 de abril de 1985, natural de Uberaba – MG, filha de Jose Lúcio Fernandes e Aparecida Donizete Fernandes. Ingressou na Universidade de Uberaba em 2003, onde cursou Medicina Veterinária o qual concluiu em 2007. Em 2008 cursou residência Médico Veterinário no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia na área de clínica dos animais domésticos e patologia animal concluída em 2010. Nesse mesmo ano iniciou Mestrado na área de Saúde Animal, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, também pela Universidade Federal de Uberlândia.

Nenhum artigo é capaz de ensinar o que precisamos aprender com o coração. Dedico este trabalho aos animais, por darem sentido à minha vida; pela companhia, paciência, e carinho sempre retribuído. A convivência com eles me torna uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus por guiar meus passos....

A minha família, minha mãe (Aparecida) e irmãs (Renata, Lilian e Adriana), sobrinhos (Paulo Henrique, Dudinha, Larinha e Bruna) meu porto seguro.
Ao Eduardo pela dedicação, apoio, paciência e amor.

Á minha orientadora Alessandra e professora Geórgia por todo ensinamento, pela paciência, amizade, confiança, e por acreditar em meu potencial.

Aos meus amigos do mestrado por compartilhar esse momento juntos, Lilian, Diego, Pablito, Igor, Nice e Tathi. E aos meus amigos Flavinha, Luis, Paulinha e Monize pelo companheirismo e por todos vocês serem minha segunda família.

Aos professores Rodrigo e Matias pelo ensinamento e por ceder o laboratório de Patologia Animal e os materiais de todo o experimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	XIII
PALAVRAS-CHAVE.....	XIII
ABSTRACT.....	XiV
KEYWORDS.....	XiV
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Neoplasias mamárias.....	3
Fatores Prognósticos.....	5
Classificação Histológica.....	8
Infiltrado Inflamatório Associado ao Tumor.....	11
Linfócitos T.....	12
Macrofágos.....	13
MHC II.....	14
Linfócitos B.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
Amostras.....	16
Acompanhamento Clínico.....	16
Avaliação Histopatológica.....	17
Imuno-histoquímica.....	17
Análise Estatística.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
Classificação Histológica dos Tumores.....	21
Variáveis Clínico-Patológicas.....	22
Infiltrados de Linfócitos T (CD3).....	28
Infiltrados de Linfócitos B (IgG).....	33

Infiltrados de Macrófagos (MAC 385 e CD68).....	36
Células que expressam MHC II (TAL IB5).....	40
Aspectos de sobrevivência.....	44
Tipo Histológico X Idade.....	51
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS.....	64

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Sistema de estadiamento de tumores mamários caninos, propostos por OMS.....	06
Tabela 2: Classificação histológica de neoplasias mamárias caninas.....	10
Tabela 3: Anticorpos utilizados para marcação do infiltrado inflamatório, com as respectivas diluições.....	18
Tabela 4: Classificação histológica dos tumores espontâneos de mama de cadelas, Uberlândia, 2012.....	22
Tabela 5: Percentual e intensidade de marcação de CD3 em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	29
Tabela 6: Percentual e intensidade de marcação de IgG em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	35
Tabela 7: Percentual e intensidade de marcação de CD68 em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	37
Tabela 8: Percentual e intensidade de marcação de MAC 385 em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	38
Tabela 9: Percentual e intensidade de marcação de TAL 1B5 em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	41

Tabela 10: Média de intensidade de marcação molecular para cada tipo histológicos de tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia, 2012.....	43
Tabela 11: Tipo histológico e média de sobrevida de cadelas com tumores mamários espontâneos, Uberlândia, 2012.....	47
Tabela 12: Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com as variáveis tamanho tumoral, presença de ulceração cutânea e uso de hormônio como método contraceptivo.....	49
Tabela 13: Correlação com vários tipos histológicos e a média de idade de cadelas com tumores mamários.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Graduação da expressão do sistema de cruces para avaliação imunohistoquímica, segundo Allred et al. (1988).....	19
Figura 2: Raças mais frequentemente acometidas por tumores mamários espontâneos, Uberlândia-MG.....	23
Figura 3: Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a raça, Uberlândia-MG.....	24
Figura 4: Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a idade, Uberlândia-MG.....	25
Figura 5: Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com o tamanho T1 (<3 cm), T2 (entre 3 a 5 cm) e T3 (>5 cm), Uberlândia-MG.....	26
Figura 6: Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a presença de ulceração, Uberlândia-MG.....	28
Figura 7: Percentual e intensidade de marcação de CD3 em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia-MG.....	29
Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto I, imunorreativo para marcação CD3. Aumento de 10X, Uberlândia-MG.....	30
Figura 9: Fotomicrografia de carcinoma complexo, notar marcação no citoplasma nos linfócitos T no infiltrado inflamatório. Aumento 10 (A) e 40X (B). Uberlândia-MG.....	31

Figura 10: Fotomicrografia de imunomarcção para IgG em carcinoma complexo. Aumento de 10x. Uberlândia-MG.....	34
Figura 11: Percentual e intensidade de marcação de IgG em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia-MG.....	34
Figura 12: Percentual e intensidade de marcação de CD68 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia-MG.....	37
Figura 13: Percentual e intensidade de marcação de MAC 385 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia-MG.....	38
Figura 14: Fotomicrografia de imunomarcção de CD68 em carcinoma em tumor misto. Aumento de 40x. Uberlândia-MG.....	39
Figura 15: Fotomicrografia de imunomarcção de MAC 385 em carcinoma em tumor misto. Uberlândia-MG. Aumento 10x.....	39
Figura 16: Percentual e intensidade de marcação de TAL IB5 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia, 2012.....	41
Figura 17: Fotomicrografia de imunomarcção de TALIB5 em adenoma complexo. Uberlândia-MG. Aumento de 10x.....	42
Figura 18: Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com a variável tamanho tumoral.....	49
Figura 19: Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com a variável ulceração cutânea.....	50

CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM TUMORES MAMÁRIOS ESPONTÂNEOS CANINOS

RESUMO - O objetivo foi verificar a associação entre raça e idade das cadelas com ocorrência de tumores malignos; verificar correlação com a utilização de hormônios como método contraceptivo, manifestação de pseudociese, tamanho do tumor e presença de ulceração com o tipo histológico maligno ou benigno. Caracterizar o infiltrado inflamatório dos tumores de mama por meio de marcadores moleculares para linfócitos T (CD3), linfócitos B (IgG), macrófagos (MAC 387 e CD68) e células que expressam MHC II (TAL IB5) utilizando a técnica de imuno-histoquímica. Comparar os infiltrados inflamatórios presentes nos tumores benignos e malignos. Avaliar a influência do tamanho do tumor, presença de ulceração, uso de hormônios como método contraceptivo, tipo histológico do tumor de mama sobre a sobrevivência das cadelas. Foram utilizadas 80 fêmeas caninas, portadoras de neoplasias mamárias, atendidas junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) entre 03/2010 a 03/2011. O método de imuno-histoquímica empregado foi o Complexo Estreptoavidina- Biotina Peroxidase. Dos 80 tumores incluídos no estudo, 90% foram classificados como malignos e 10% como benignos. E 45% destes eram de cadelas sem raça definida (SRD) e, entre as cadelas de raça, as mais comuns foram coocker, pinscher (10%) e poodle (7,5%). Segundo a faixa etária, 19 cadela tinha entre dois a oito anos de idade e 61 eram cadelas que tinham mais de oito anos de idade. Entre essas cadelas 76,25% não possuíam histórico de administração de hormônios contraceptivos e 23,75% utilizaram hormônios como método contraceptivo. A pseudociese foi observada em 24 cadelas. Avaliação da correlação do tamanho do tumor, e da ulceração cutânea com a malignidade ou benignidade, não houve diferença estatística entre estas variáveis. As neoplasias malignas foram predominantes, sendo o tipo carcinoma de maior frequência e entre os benignos o tumor misto foi o mais comum. Não há correlação estatística entre malignidade da utilização de hormônios, pseudociese, tamanho de tumor e ulceração. Tumores malignos assim como os benignos não apresentam diferença estatística com relação a frequência de infiltrado inflamatório, quando utiliza-se como marcadores do processo inflamatório CD3, IgG, MAC 385, CD68, TAL IB5. Não há influência da presença de ulceração, utilização de hormônios, ou ocorrência de tumores malignos ou benignos sobre a sobrevivência de cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos. Mas, o tamanho de tumores influencia a sobrevivência das cadelas, sendo que as cadelas com tumores de tamanhos maiores possuem menor sobrevivência.

Palavras-Chave: cadela, linfócitos, macrófagos, glândula mamária.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF INFLAMMATORY INFILTRATE IN CANINE MAMMARY TUMORS SPONTANEOUS

SUMMARY - The objective was to assess the association between race and age of dogs with the occurrence of malignant tumors; check correlation to the use of hormones as a contraceptive method, expression of pseudopregnancy, tumor size and presence of ulceration with histological malignant or benign type. Characterize the inflammatory infiltrate of breast tumors by means of molecular markers for T lymphocytes (CD3), B lymphocytes (IgG), macrophages (MAC 385 and CD68) and cells expressing MHC II (TAL IB5) using the technique of immunohistochemistry. Compare the inflammatory infiltrates present in benign and malignant tumors. To evaluate the influence of tumor size, presence of ulceration, use of hormones as a contraceptive method, histologic type of breast cancer on survival of dogs. We used 80 female dogs, suffering from breast cancer, consulted in Veterinary Hospital of Federal University of Uberlândia (UFU) between 03/2010 a 03/2011. The method used of immunohistochemistry was biotin-streptavidin complex. Of the 80 tumors included in the study, 90% were classified as malignant and 10% as benign. And 45% of these were of bitches (SRD) and among bitches race, the most common were cocker, pinscher (10%) and poodle (7,5%). According to age, 19 dog had from two to eight years of age and 61 were female dogs that had more than eight years old. Among these bitches 76,25% had no history of administration of contraceptive hormones and 23,75% used contraception hormones. A pseudocyesis was observed in 24 dogs. Assessment of correlation between tumor size, and skin ulceration with malignancy or benignity, no statistical difference between these variables. The malignancies were predominant and the type of cancer more often and among the benign mixed tumor was the most common. There is no statistical correlation between malignancy of the use of hormones, pseudopregnancy, tumor size and ulceration. Malignant tumors as well as benign do not present statistical difference in the frequency of inflammatory infiltrate, when used as markers of inflammation CD3, IgG, MAC 385, CD68 E TAL IB5. No influence of the presence of ulceration, use of hormone, or the occurrence of benign or malignant tumors on survival of dogs suffering from spontaneous mammary tumors. But the size of tumors influence the survival of bitches, and bitches with tumors of larger sizes have shorter survival.

Keywords: dog, lymphocytes, macrophages, mammary gland

I. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários representam um grande desafio à medicina veterinária (CASSALI et al., 2011), pois representam de 25 a 50% de todos os tumores documentados em cadelas (MILLANTA et al., 2005), sendo que 60% dos tumores diagnosticados são de origem maligna (CARVALHO, 2009). Tumores da glândula mamária afetam cadelas de meia idade e idosas, sexualmente intactas ou castradas (CASSALI et al., 2011).

A maioria das cadelas com neoplasias mamárias é clinicamente saudável no momento do diagnóstico e os tumores podem ser identificados pelo proprietário ou profissional durante exame físico. Porém, quando o diagnóstico e tratamento de tumores malignos são retardados pode ocorrer a morte das cadelas. A sobrevida em cadelas diagnosticadas com tumores de mama pode variar. Estimativas de risco de vida para tumores malignos variam de 2 a 20% (LANA et al., 2007).

Tumores mamários em cães prestam-se como modelos apropriados ao estudo da biologia do câncer, assim como para testes de agentes terapêuticos, já que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos. Caninos e humanos também compartilham importantes fatores epidemiológicos, clinicopatológicos e bioquímicos dos tumores mamários (ZUCCARI et al., 2008).

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) 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. A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores que foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da imuno-histoquímica. Um dos caminhos para se diminuir a mortalidade por câncer de mama seria a descoberta de marcadores que poderiam auxiliar o clínico a identificar pacientes com tumores potencialmente agressivos, para a instituição de terapia adequada capaz de alterar o curso da doença (ANDRIOLO, 1996).

O sistema imune exerce papel paradoxal sobre os tumores, pois é capaz de proteger o hospedeiro do surgimento e também promover o crescimento do tumor. Determinadas populações de células de defesa exercem efeito protetor e são correlacionadas com maior sobrevida, maior taxa de citorredução, e melhor resultado clínico. Outras afetam negativamente a sobrevivência dos pacientes e estão associadas à inibição das respostas imunológicas protetoras. (MARREL; HEROY, 2003, DALTÓE et al., 2010).

Devido à alta incidência de neoplasias mamárias caninas, informações como tipo histológico e taxa de sobrevida são extremamente importantes para contribuição nas pesquisas de oncologia veterinária. Além disso, a imunofenotipagem do infiltrado inflamatório peritumoral auxiliará no entendimento da resposta dessa neoplasia. Assim, o objetivo deste estudo foi:

- verificar a associação entre raça e idade das cadelas com ocorrência de tumores malignos;

- verificar a correlação da utilização de hormônios como método contraceptivo, manifestação de pseudociese, tamanho do tumor e presença de ulceração com o tipo histológico maligno ou benigno;

- caracterizar o infiltrado celular inflamatório dos tumores de mama por meio de marcadores moleculares para linfócitos T (CD3), linfócitos B (IgG), macrófagos (MAC 387 e CD68) e células que expressam complexo principal de histocompatibilidade (MHC) II (TAL IB5) utilizando a técnica de imunohistoquímica;

- comparar os infiltrados inflamatórios presentes nos tumores benignos com aqueles presentes nos tumores malignos;

- avaliar a influência do tamanho do tumor, presença de ulceração, uso de hormônios como método contraceptivo, tipo histológico do tumor de mama com a taxa de sobrevida das cadelas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Neoplasias mamárias

As neoplasias mamárias podem ocorrer em qualquer mama, mas é observada com maior frequência nas mamas inguinais (70%). Acredita-se que essa predileção seja pelo maior volume de tecido mamário (QUEIROGA e LOPES, 2002), pelo fato de estarem sujeitas a maior ação hormonal e a traumas advindos dos membros pélvicos. Os carnívoros domésticos não entram em menopausa, e as mamas continuam sujeitas às influências hormonais até idade avançada (ZUCCARI et al., 2001).

Neoplasias mamárias caninas geralmente se apresentam como nódulos circunscrito, de tamanho e consistência variável, e apresentando mobilidade ou aderências em pele e/ou músculo. Podem estar acompanhadas de ulcerações de pele e reações inflamatórias locais. Múltiplos tumores são frequentemente observados em uma única glândula mamária ou podem envolver várias glândulas mamárias simultaneamente (tumores multicêntricos) e podem ser de diferentes tipos histológicos (RUTTEMAN et al., 2001; CASSALI et al., 2011).

Segundo Sorenmo et al. (2011) os dois principais fatores para o desenvolvimento de tumores mamários são idade e hormônios; além de vários fatores adicionais como raça, dieta, obesidade que também tem sido associados a um risco maior de desenvolvimento de câncer.

A idade média de cadelas que manifestam tumor é 10 a 11 anos de idade, com ocorrência rara em cães com menos de quatro anos (LANA et al., 2007). A idade é um dos fatores de risco mais importante para desenvolvimento de tumores de mama e o risco começa a ser tornar significativo a partir dos oito anos de idade e aumenta com passar dos anos. Cadelas jovens são propensas a desenvolver tumores benignos, e a chance de malignidade aumenta com a idade. Tumores mamários são raros em cães com idade inferior a cinco anos, a menos que se sejam tratadas com hormônios (SORENMO et al., 2010).

Neoplasias mamárias podem ocorrer em qualquer cadela e não existe um consenso sobre a predisposição racial, mas alguns autores afirmam maior incidência entre cães de raça pura quando comparada com cães sem raça definida (CARVALHO, 2009). Segundo Lana et al. (2007) as raças spaniel,

poodle e dashchund parecem possuir predisposição a essa condição. A incidência de tumores malignos foi diferente em cães de pequeno porte em comparação com cães grande porte. Neste estudo 25% dos cães de pequeno porte possuíam tumores malignos em comparação com 58% dos pacientes de grande porte. Existe ainda predileção racial relacionada à condição genética. O componente genético é confirmado pelo fato de alguns estudos comprovarem que famílias dentro de raças específicas possuem maior risco do que outras de desenvolverem tumores de mama (SORENMO et al., 2010).

Dados sobre a relação da pseudociese com o desenvolvimento de tumores mamários são conflitantes. Oliveira Filho (2010) observou que cadelas que tiveram pseudociese apresentam um número maior de neoplasias malignas do que aquelas que não tiveram pseudociese. Morris et al. (1998) afirma que a pseudociese não tem relação alguma com o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Cadelas com pseudociese recorrente apresentam altas concentrações de prolactina, predispondo à formação de tumores de mama; o leite retido cronicamente pode conter compostos químicos que exerçam efeito carcinogênico sobre o epitélio adjacente (ZUCCARI et al., 2001). Além disso, a hipóxia celular, resultante da distensão dos ácinos, repletos de secreção láctea, leva à formação de radicais livres, os quais possuem efeito na carcinogênese. Entretanto, a pseudogestação assim como a idade à primeira prenhez, número de gestações, ciclos estrais irregulares são fatores contraditórios. Ainda não foram determinadas as influências na carcinogênese mamária (MORRISON, 1998).

A castração tardia não parece reduzir o risco de formação de tumores mamários, porém o risco de desenvolver tumores benignos parece ser reduzido após a ovariectomia, mesmo em idade mais avançada (LANA et al., 2007). Esses achados são consistentes com as conclusões de que a exposição à hormônios ovarianos no início da vida da cadela tem maior efeito sobre o risco de formação tumoral (SORENMO et al., 2010). O risco de desenvolver tumores em cadelas castrada antes do primeiro cio é de 0,05%, após o primeiro cio é de 8% e sobe para 26% após o segundo cio. O risco de desenvolvimento de câncer de mama é determinado pela intensidade e duração da exposição do epitélio mamário à ação conjunta da prolactina e

estrogênio (SILVIA et al., 2004). O efeito protetor da gravidez visto em mulheres parece não ocorrer em cadelas (LANA et al., 2007).

Fatores prognósticos

Os principais fatores prognósticos estão relacionados com as características clínicas do tumor (tamanho, presença de ulceração cutânea, crescimento rápido recente), com o estágio clínico da doença (invasão regional ou à distância), e com as características histológicas (tipo histológico, grau nuclear e índice mitótico) (QUEIROGA e LOPES, 2002).

Cerca de 50% dos tumores mamários são malignos, e entre os malignos a maioria é de carcinomas, sendo o tipo histológico principal fator de prognóstico para os tumores de mama. Entre os tumores benignos os adenomas são os mais comuns (OLIVEIRA et al., 2003).

A ulceração cutânea associada a neoplasia também tem sido associado a menor sobrevida. A ulceração decorrente de neoplasias mamárias é um processo não obrigatório que ocorre em virtude de complicações durante a evolução da doença (QUEIROGA e LOPES, 2002; ZUCCARI, 1999).

Existem três tipos de recorrência no câncer de mama. A recorrência local, na qual as células tumorais permaneceram no local original e após algum tempo voltam a proliferar. Para muitos pesquisadores a recorrência local não é considerada como disseminação do câncer mamário, e sim como um fracasso do tratamento primário. Mesmo depois da mastectomia, os tecidos mamários próximos à pele e tecido adiposo permanecem possibilitando a recorrência local. A recorrência regional é mais grave que a local por indicar que o câncer se disseminou além dos limites da mama e linfonodos regionais. Pode ocorrer na musculatura peitoral, abdominal, nos linfonodos mais internos, entre as costelas, entre outros. A recorrência a distância, ou seja, a metástase, é sem dúvida a mais grave delas. Uma vez fora do tecido mamário, usualmente o câncer pode se disseminar para os linfonodos regionais e a partir deste para qualquer outro local do organismo (ZUCCARI, 1999).

A presença de metástase regional e o tamanho do tumor são fatores que indicam o estágio tumoral e são utilizados no sistema de estadiamento proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), além de fornecerem

dados de valor prognóstico que podem ser utilizados em um plano de tratamento em cadelas doentes (Tabela 1).

O tamanho do tumor tem valor prognóstico, pois tumores menores são significativamente mais propensos a serem benignos do que tumores de maiores dimensões. Sendo assim, o risco de malignidade aumenta com o aumento do tumor (SORENMO, et al., 2010). Quando se avalia o tamanho do tumor como fator prognóstico, a OMS propõe a classificação por categorias: T₁ para tumores menores que três centímetros (T₁ ≤ 3 cm); T₂ para tumores de três a cinco centímetros (T₂: 3-5 cm); T₃ quando tumores possuem tamanho maior que cinco centímetros (T₃ ≥ 5 cm) (RICHARDS et al., 2001). Cadelas com tumores T₁ apresentam maior sobrevida quando comparados ao T₂ e T₃ e não houve diferença quando comparados T₂ e T₃ (SORENMO et al., 2010).

As metástases nos cães podem ocorrer por via linfática ou venosa. Nos carcinomas mamários, a via linfática parece ser a mais importante. A drenagem linfática faz-se para os gânglios linfáticos axilares e inguinais (BURINI, 2007). Metástases em linfonodos regionais é outro fator prognóstico, de acordo com o estadiamento é classificado como N₀ (sem metástase) e N₁ (com metástase) com base em citologia ou histopatologia (RUTTEMAN et al., 2001).

Tabela 1: Sistema de estadiamento de tumores mamários caninos, proposto por OMS.

Estágio	Tamanho	Metástase regional	Metástase à distância
Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
Estágio IV	Qualquer tamanho	N1	M0
Estágio V	Qualquer tamanho	N0 ou N1	M1

Tamanho (T)	
T1 ≤ 3 cm	
T2 3-5 cm	
T3 ≥ 5 cm	

Metástase regional em linfonodo (N)	Metástase à distância
N0: Sem metástase	M0: Sem metástase
N1: Com metástase	M1: Com metástase

Fonte: Rutteman et al, 2001.

Os estudos sobre estágio e prognóstico muitas vezes sofrem limitações por não haver padronização de procedimentos de testes e abordagem cirúrgica e seguimento de monitoramento. Estas limitações na coleta de dados e variações podem estar sendo subestimadas ou superestimadas e resultando em análises erradas (SORENMO et al., 2010).

Tumores mamários benignos podem sofrer transformação espontânea ao longo de um período para tumores malignos. A progressão histológica para malignidade é observada em cadelas com múltiplos tumores mamários (MOULTON et al., 1986). Tumores múltiplos clinicamente parecem ser tumores separados e discretos com vários tamanhos e tipos histológicos, mas etiologicamente estão relacionados (SORENMO et al., 2010).

Câncer de mama com metástase ainda é considerado como uma doença incurável tanto na medicina humana como na Veterinária, sendo um dos fatores prognósticos mais importantes. Micrometástases não detectáveis clinicamente, certamente contribuem para a recorrência da doença nas pacientes portadoras de câncer de mama, no entanto pouco se conhece a respeito do mecanismo celular responsável por este controle (KLAUBER et al., 2001). Dentre os locais mais comuns para metástases das neoplasias mamárias malignas, podem ser citados os linfonodos, pulmões, ovários, rins, adrenais, fígado e baço, sendo o pulmão o local mais comum para metástases a distância em cadelas com tumores mamários. Isto ocorre devido ao imenso fluxo de sangue que passa por este órgão e à grande trama de capilares, onde a circulação se torna mais lenta. O leito capilar pulmonar serve como filtro para os agregados de células tumorais que se alojam na árvore vascular, inserindo pseudópodos entre as células endoteliais e emigrando para o parênquima pulmonar. Exames de ultrassom e radiografias devem ser realizados para identificar outros sítios suspeitos de metástases (FERREIRA et al., 2003; QUEIROGA e LOPEZ, 2002; JONES et al., 2000).

Os sarcomas são descritos como sendo os tipos histológicos com pior prognóstico, seguidos pelos carcinomas sólidos; e os sarcomas possuem ainda capacidade de metástases maior que os carcinomas. Os tumores associados a melhor prognósticos são os adenocarcinomas e carcinoma "in situ" (BURINI, 2007).

Classificação Histológica

Os tumores mamários apresentam grande complexidade, em parte devido à estrutura histológica heterogênea do próprio tecido mamário, podendo ser oriundos das células epiteliais ductais e/ou alveolares, das células mioepiteliais e/ou das células do tecido conjuntivo intersticial. Deste modo, podemos afirmar que estas neoplasias desafiam os clínicos e patologistas, devido tanto ao seu inesperado comportamento biológico como também à sua diversidade morfológica (CARVALHO, 2009).

A importância da classificação histológica reside na capacidade de prever o comportamento biológico do tumor e, atualmente, foi proposto um novo sistema de classificação por Cassali et al. (2011) (Tabela 2).

Os tumores mamários são compostos por parênquima e estroma, o parênquima é constituído por células de origem epitelial ou mesenquimal, e o estroma por fibrovascularização. A nomenclatura dá-se de acordo com o tecido de origem, padrão de crescimento e comportamento biológico. E as neoplasias mamárias ainda podem ser constituídas de células de origem epitelial e mesenquimal ao mesmo tempo, sendo denominadas de tumor misto mamário (ZUCCARI et al., 2001).

Entre os tumores de mama benignos mais comuns estão os adenomas, adenomas complexos e tumor misto benigno. Adenoma é um tumor benigno com células epiteliais ou mioepiteliais bem diferenciadas e são classificados como simples ou complexo. Os adenomas complexos são provenientes de células epiteliais ou mioepiteliais e sua diferenciação com carcinomas pode ser difícil. O fibroadenoma é proveniente da proliferação de elementos epiteliais e estromais e existe o fibroadenoma pericanicular, intracanicular e o de celularidade alta e baixa. O tumor misto benigno é caracterizado por células benignas que são semelhantes a células epiteliais e células mesenquimais que produzem cartilagem, osso ou tecido adiposo em combinação com tecido fibroso (MOULTON, 1990).

Entre os tumores malignos, os carcinomas são a maioria apresentando vários tipos histológicos. O carcinoma "in situ" é caracterizado por proliferação de células epiteliais malignas extralobulares ductais e podem ser classificados em carcinoma "in situ" lobular ou ductal (os mais comuns) (CASSALI et al.,

2011). Frequentemente são multicêntricos e não são, geralmente, visíveis macroscopicamente, podendo ser parte de lesões fibrocísticas ou encontrados próximos a carcinomas invasivos e outros tipos de tumores (MOULTON, 1990).

O carcinoma complexo é relativamente comum em cães. Geralmente são tumores lobulados, composto por células epiteliais e mioepiteliais (TAVARES et al., 2006). O epitélio luminal pode ter apresentação tanto tubulopapilar como também sólida. Pode ocorrer metaplasia escamosa em alguma porção. O tipo fusiforme de células mioepiteliais frequentemente é composto por arranjos celulares de forma reticulada. O crescimento expansivo é comum, e a invasão junto aos vasos linfáticos é rara (10%) (TAVARES et al., 2006). O carcinoma complexo podem ser difícil a diferenciação com adenoma complexo. Ausência de cápsula, crescimento infiltrativo, alta celularidade, necrose e elevados índices de mitose são indicativos de malignidade, tempo médio de sobrevivência de dez meses (TAVARES et al., 2006).

Carcinoma em tumor misto apresenta um complexo padrão histológico, pois possui componentes de origem epitelial e mesenquimal, contêm focos de células epiteliais com pleomorfismo elevada e mitoses atípicas, apresentam crescimento infiltrativo (CASSALI et al., 2011).

Carcinoma papilífero caracteriza-se por proliferação papilar epitelial com estroma fibrovascular. Carcinoma tubular consiste de proliferação epitelial, disposto de uma forma predominantemente tubular e possui capacidade de infiltração de tecidos adjacentes e vasos sanguíneos. Carcinomas com áreas tubulares e papilares são comuns, sendo considerado carcinoma papilar quando 60% das áreas são papilares (CASSALI et al., 2011).

No carcinoma sólido as células tumorais são arranjadas em “folhas”, “cordões” ou ninhos sólidos. Alguns são compostos por células com citoplasma vacuolizado, possivelmente de origem mioepitelial. A quantidade de estroma varia de pouca a moderada (MOULTON, 1990) e áreas de necrose são comuns, sendo, portanto umas das neoplasias mamárias mais comuns nas cadelas (CASSALI et al., 2011).

Entre os sarcomas, o fibrossarcoma é o mais diagnosticado em cadelas e são tumores malignos de fibroblastos com quantidades variáveis de colágeno. Os carcinosarcomas são tumores de origem epitelial e

mesenquimal, de crescimento rápido e as características histológicas desse tipo de tumor são extremamente variáveis. Esse tipo de tumor foi anteriormente denominado de tumor misto maligno, e é composto por células que se assemelham a células epiteliais (CASSALI et al., 2011).

Tabela 2. Classificação histológica de neoplasias mamárias caninas.

Tumores benignos	
	Adenoma simples Adenoma complexo Fibroadenoma Tumor misto benigno Ductal papiloma
Tumores Malignos	
	Carcinoma “in situ” Carcinoma em tumor misto Carcinoma complexo Carcinoma papilar Carcinoma tubular Carcinoma solido Carcinoma simples papilar/ tubular/ Tubulopapilar
Carcinomas especiais	
	Carcinoma micropapilar Carcinoma lobular invasivo Carcinoma lobular pleomorfico Carcinoma secretório Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídeos Carcinomas células ecamosas Carcinomas de células fusiformes Carcinoma anaplásicos Neoplasias mamárias com diferenciação sebácea
Sarcomas	
	Fibrossarcoma Osteossarcoma Carcinosarcoma
Outros sarcomas	
	Condrossarcoma Lipossarcoma Hemangiossarcoma

Fonte: CASSALI et al, 2011.

Infiltrado Inflamatório associado ao tumor

O reconhecimento de uma célula tumoral pelo sistema imunológico pode se processar de maneiras distintas e complementares; e elementos da imunidade inata e da imunidade adaptativa contribuem para resposta imune contra os tumores (CHAMMAS et al., 2004).

Estudo em vários tecidos vem demonstrando forte infiltração de leucócitos intratumoralmente e nas adjacências dos tumores. Nos cânceres, estas células de defesa são recrutadas em resposta ao tumor, em decorrência da inflamação ou por substâncias produzidas pelas células tumorais. Porém, ao mesmo tempo em que o sistema imune pode proteger, podem também promover o crescimento de tumores com imunogenicidade reduzida. A caracterização (tipo, densidade e localização) das células imunes infiltrantes pode permitir uma melhor predição do resultado clínico do que outros parâmetros histopatológicos usados (VAKKILA et al., 2004).

As células inflamatórias que infiltram os tumores, incluindo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, linfócitos e plasmócitos podem modificar intensamente o microambiente tumoral, produzindo citocinas, fatores de crescimento, mediadores citotóxicos, fatores angiogênicos e inibidores incluindo proteinases, TNF- α , ILs e INFs e outros compostos (DALTÓE et al., 2010).

As citocinas são moléculas peptídicas que participam de forma proeminente do processo inflamatório facilitando não somente o crescimento da neoplasia como também o aparecimento de metástases (HEIMANN et al., 1997). Elas são mediadoras diretas das interações entre as células, portanto reguladoras das funções celulares e teciduais. A produção e liberação de citocinas são processos celulares estritamente regulados, podendo ser desregulado por transformações malignas (ALTUCCI e GRONEMEYER, 2001).

O infiltrado inflamatório constitui a resposta imunitária do organismo, numa tentativa de rejeição do tumor. Por outro lado, as quimiocinas atuam como fatores de crescimento para as células tumorais e são angiogênicas, providenciando vasos que medeiam à invasão e servem como rotas para a metastatização (MARELL; LEROY, 2003).

O processo inflamatório associado ao processo neoplásico envolve uma complexa resposta do hospedeiro e estudos imuno-histoquímicos tem demonstrado um predomínio de linfócitos e macrófagos em carcinomas mamários, portanto a presença do infiltrado inflamatório era associada a uma resposta contra o crescimento do tumor, assim não há consenso sobre a eficácia da resposta antitumoral mediada por linfócitos ou por subpopulações de linfócitos (ESTRELA-LIMA et al., 2010).

Linfócitos T

Os linfócitos T são células da imunidade celular, reconhecem antígenos de microorganismos intracelulares. Seus receptores de antígenos são moléculas presentes na membrana e apresenta uma especificidade restrita para antígenos ligados a proteínas de hospedeiros que são codificadas pelos genes do complexo de MHC que se expressam em outras células (ABBAS et al., 2007).

Embora o infiltrado linfocitário seja considerado uma manifestação da resposta imune contra o tumor, o papel central das células T na imunidade antitumoral ainda é controverso (VESALAINEN et al., 1994)). Os estudos de detecção da infiltração de linfócitos T em neoplasias caninas não são muito numerosos, havendo alguns estudos em tumor venéreo transmissível, em seminomas e em histiocitoma cutâneo canino (PÉREZ et al.; 1998). A infiltração linfocitária dos tumores está descrita em vários tumores malignos e sua função é desconhecida, e enquanto que nos tumores da mama humanos este infiltrado parece estar relacionado com pior prognóstico (GEORGIANNOS et al., 2003).

A presença dos linfócitos infiltrados no tumor tem sido correlacionada com o tamanho, estágio do tumor e a sobrevida do paciente, incluindo as de cólon e reto, as de próstata e os carcinomas de estômago. Correlação inversa foi descrita em outros tipos de tumores, como no carcinoma esofágico e no carcinoma renal, em que a presença de células T foi relacionada com uma baixa sobrevida dos pacientes (VESALAINEN et al., 1994).

Para identificação dos linfócitos T, utiliza-se o anticorpo policlonal anti-CD3 que reconhece uma sequência peptídica altamente conservada do

domínio citoplasmático do CD3 de várias espécies. O CD3 é um complexo de proteínas presente em todas as células T, que atua como transdutor de sinal (TIZARD, 2000; MORRIS et al. 2002).

Macrófagos

Os macrófagos são membros do sistema fagocitário mononuclear e entre suas funções estão a fagocitose de partículas estranhas, produção de citocinas pro-inflamatórias e apresentação de antígeno para linfócitos T (DALTÓE et al., 2010).

Macrófagos associado ao tumor (MATs) são um importante componente de infiltrado inflamatório nos tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que são recrutados em grande parte por monócitos quimiotáticos. MATs tem um duplo papel na neoplasia, embora possam matar as células neoplásicas após a ativação por IL-2, também produzem um número de potentes fatores de crescimento angiogênicos e linfangiogênicos, citocinas e proteases, os quais são mediadores que potencializam progressão neoplásica. MATs e células tumorais produzem IL-10 que efetivamente embotam a resposta anti-tumoral por células T citotóxicas. Durante o desenvolvimento neoplásico os macrófagos ativados produzem metabólitos do ácido araquidônico e proteases extracelulares. Em resposta aos tumores expressam IL-8 e fator de crescimento endotelial vascular, induzindo angiogênese sob o controle parácrino. MATs podem expressar VEGF-D e VEGF-E, bem como VEGF receptor 3 todos implicados na formação de vasos linfáticos e metástases linfáticas. MATs também favorecem a disseminação de tumores quando estão no recrutamento e resposta a estímulos angiogênicos e linfangiogênicos (LISA et al., 2002; LEEK;HARRIS, 2002), e podem ter um papel anti-tumoral, apresentando os antigênicos tumorais às células T citotóxicas, sendo capazes de se tornarem diretamente citotóxicos para as células tumorais (LEEK; HARRIS, 2002).

Para identificação dos macrófagos, utiliza-se o clone MAC 387, que reconhece a proteína mielomonocítica L1 ou calprotectina, uma proteína citoplasmática dos granulócitos, monócitos e macrófagos de diferentes tecidos e o marcador CD68, pertencente a uma família de ácidos, altamente

glicolisados, encontrado em grânulos citoplasmáticos e em superfície de macrófagos, monócitos, neutrófilos, basófilos e linfócitos (BRANDTZAEG et al., 1988).

MHC II

A expressão de moléculas do MHC II ocorre em células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos) e linfócitos, e estas moléculas desempenham um papel importante no reconhecimento imunológico. São derivadas de proteínas extracelulares e estudos mostram o envolvimento de MHC II no controle da resposta imune humoral e resposta mediada por células. O MHC II quando ativado pode mediar adesão celular, produção de citocinas, proliferação celular e apoptose. Todas essas funções são importantes para o controle do câncer, doenças infecciosas e autoimunes (ABBAS et al., 2007).

Células tumorais podem expressar moléculas de MHC, o que representa a evasão da célula tumoral a elementos do sistema imune e há o reconhecimento por células NK (Natural Killer), macrófagos e linfócitos que reconhecem antígenos da célula tumoral através desses receptores. Em células que apresentam os níveis de MHC-normais a função dessas células é inibida. As células apresentadoras de antígenos podem capturar antígenos tumorais, processá-los e apresentá-los em um contexto MHC I e MHC II juntamente com co-estimulação (CHAMMAS et al., 2004).

Linfócitos B

Os linfócitos B fazem parte de 5 -15% da população de linfócitos circulantes, que se originam na medula óssea e se desenvolvem em órgãos linfóides. São responsáveis pela imunidade humoral, fazem reconhecimento direto de antígenos através de proteínas de superfícies, marcadores fenotípicos. Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos, eles reconhecem antígenos extracelulares e se diferenciam de células secretoras de anticorpos, funcionando, assim, como mediadores de imunidade humoral. As células B expressam anticorpos nas suas membranas que servem de receptores para reconhecer antígenos e iniciam o processo de

ativação de células e esses receptores são moléculas de Igs de diferentes classes (JANEWAY et al., 2009).

Os linfócitos B participam da resposta imune (adaptativa) contra tumores produzindo anticorpos específicos contra antígenos tumorais. Esses anticorpos se ligariam a antígenos específicos nas células tumorais facilitando seu reconhecimento e destruição pelas células NK ou fagocitose por macrófagos, ou ainda ativando a via do complemento, e causando a lise tumoral (CHAMMAS et al., 2004).

III. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Neste estudo foram utilizadas 80 fêmeas caninas, portadoras de neoplasias mamárias, atendidas junto ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) entre 03/2010 a 03/2011. As cadelas foram submetidas a exame físico rotineiro e as variáveis clínico-patológicas consideradas neste estudo foram: a idade no momento da exérese cirúrgica do tumor, o tamanho do tumor, a presença ou ausência de ulceração cutânea e o tipo histológico.

Os proprietários responderam a questionário com informações sobre o histórico e condições do animal, principalmente sobre a utilização de hormônios, como método contraceptivo, antecedentes mórbitos, número de gestações, pseudociese e histórico familiar.

Quanto à faixa etária os cães foram agrupados como: filhotes (até um ano de idade), adultos (dois a oito anos) e idosos (mais de nove anos).

Em relação ao tamanho da neoplasia foi considerado o sistema proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), agrupando os tumores em três categorias: menores de três centímetros (T_1), entre três e cinco centímetros (T_2) e maiores que cinco centímetros (T_3). Após os exames as cadelas eram encaminhadas para tratamento cirúrgico de mastectomia radical.

Acompanhamento clínico

Todos os animais foram submetidos a tratamento cirúrgico sem tratamento quimioterápico adicional.

Semestralmente os proprietários foram contactados e responderam questões relativas à progressão da doença. Nas situações em que o animal se encontrava vivo, os proprietários foram interrogados em relação ao seu estado geral e ocorrência de recidivas e/ou metástases. Quando ocorria o óbito, procurou-se obter informações referentes à data, causas e condições do mesmo. O tempo de sobrevivência foi considerado desde o momento do diagnóstico até o momento do óbito ou o término do experimento.

Avaliação Histopatológica

Os tecidos recolhidos por excisão cirúrgica foram examinados e o material foi fixado em formol 10% durante 24 horas, processado e incluído em parafina segundo Tolosa et al. (2003). Dos blocos efetuaram-se cortes com cinco μm de espessura em micrótomo rotativo LEICA RM 2125 RT, depois foram desparafinados em xilol e hidratados numa série decrescente de alcoóis, tendo-se procedido à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Os tumores foram avaliados num microscópio Binocular Nova 106 e classificados de acordo com Cassali et al. (2011).

Imuno-histoquímica

A padronização da técnica de imuno-histoquímica para a caracterização do infiltrado celular nos tumores foi feita empregando-se os anticorpos monoclonais primários marcadores de linfócitos T (CD3), linfócitos B (IgG), macrófagos (MAC 387 e CD68) e células inflamatórias que expressam MHC II (TAL1B5) (Tabela 2).

O método de imuno-histoquímica empregado foi o Complexo Estreptoavidina- Biotina Peroxidase, desenvolvido por Shi et al. (1991), com ligeiras modificações, de acordo com cada anticorpo utilizado. Foram feitos cortes seriados de cada tumor, com cinco μm de espessura em lâminas pré-tratadas com poli-l-lisina, totalizando cinco lâminas para cada tipo histológico. Os cortes de tecido foram desparafinizados, reidratados. Na sequência, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 20 minutos ao abrigo da luz. Após essa etapa, os cortes foram lavados por três vezes em água destilada. A recuperação antigênica foi feita pelo calor utilizando microondas, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de Target (retrieval solution Dako Corporation, Denmark) permanecendo por dois minutos na potência alta e oito minutos na potência baixa. Após essa etapa, os cortes foram novamente lavados por três vezes em água destilada e, a seguir, os sítios inespecíficos bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum-free – DAKO Corporation). Ato contínuo, os cortes foram recobertos com 100 μl de anticorpo

primário na diluição ótima (Tabela 3) e, então, incubados a 4°C por dezoito horas. Depois os cortes foram novamente lavados em água destilada, e incubados com o anticorpo secundário biotilado (Kit DAKO LSAB + System) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita nova lavagem para remoção do excesso de anticorpo e procedeu-se a incubação com o complexo streptoavidinabiotina, por trinta minutos (Kit DAKO LSAB + System), à temperatura ambiente, para detecção do produto da reação. Realizou-se a revelação com o cromógeno a base de diaminobenzidina (DAB- Dako Corporation, Carpinteria, USA), incubando por um minuto em câmara úmida.

Em seguida, a reação foi interrompida com a lavagem das preparações em água destilada, e feita a contracoloração com hematoxilina de Harris por cinco minutos, lavagem em água corrente e desidratação. Nesta última etapa, realizou-se passagens rápidas, em álcool etílico 85°, 95°, absoluto I e II, xilol I e II. As lâminas foram montadas com Entellan Novo (Merck ®) e observadas em microscópio de luz.

Todas as fases de preparação das lâminas foram acompanhadas por um controle positivo e um controle negativo (sem adição de anticorpo primário, sendo substituído por PBS).

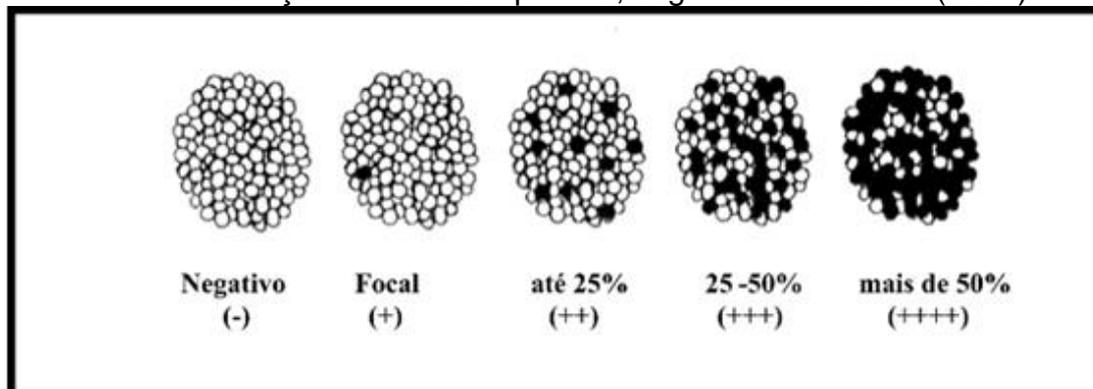
Tabela 3. Anticorpos utilizados para marcação do infiltrado inflamatório, com as respectivas diluições.

Anticorpo	Clone/procedência	Diluição
CD3	F7.2.38/ Dako A/S Denmark	1:50
CD68	M0876/ Dako A/S Denmark	1:100
MAC 385	M0747/ Dako A/S Denmark	1:100
IgG	Dako A/S Denmark	1:100
TAL IB5	M0746/ Dako A/S Denmark	1:100

A avaliação imuno-histoquímica da marcação do infiltrado inflamatório pelos diferentes anticorpos foi realizada através de contagem de células de origem epitelial ou mesenquimal que se mostraram imunopositivas. Foram escolhidos aleatoriamente 10 campos da área tumoral em objetiva de 40X, microscópio binocular Nova 106® e o percentual de células positivas era obtido e classificado em um sistema de cruzes proposto por Allred et al. (1998): uma cruz (+) quando menos de 10% das células eram marcadas pelo anticorpo, duas cruzes (++) quando se observa 10% a 25% de marcação positiva, três

cruzes (+++) marcação entre 25% a 50% e quatro cruzes (++++) mais de 50% de marcação (ALLRED, 1998) (Figura 1).

Figura 1. Graduação da expressão no sistema de cruzes para avaliação imuno-Histoquímica, segundo Allred et al. (1988).



Fonte: Tersian et al. (2007)

Análise estatística

Utilizou-se programa SYSTAT 10.2 e os conjuntos de dados foram submetidos a testes de normalidade. Para tal, cada conjunto foi avaliado quanto à curtose e simetria e comparado com a distribuição de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov). O teste de Fischer foi utilizado para verificação da homogeneidade de variâncias.

Para verificar a diferença entre o tamanho dos tumores de sua origem maligna ou benigna foi usado o teste U de Mann-Whitney.

O teste Qui-quadrado foi usado para analisar a presença de ulceração cutânea de tumores mamários e uso injetável de hormônios como método contraceptivo se estão associado com a origem do tumor.

Para avaliar se o tamanho do tumor mamário influencia a sobrevida da cadela considerando a origem do tumor (maligno ou benigno) foi usado o teste correlação de Spearman.

Ao avaliar se as variáveis ulceração cutânea e o uso contraceptivo de hormônios influenciam na sobrevida usou-se o teste Anova de dois fatores.

Ao verificar a diferença de sobrevida quanto ao tipo histológico de tumores mamários foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e, se houve diferença, teste Tukey foi usado para comparações par a par.

Para verificar a diferença entre os marcadores moleculares usou-se o teste de Kruskal-Wallis.

Ao avaliar se o infiltrado inflamatório difere de sua natureza benigna ou maligna usou-se o teste U de Mann-Whitney.

Ao verificar se a idade influência na natureza do tumor utilizou-se o teste U de Mann-Whitney. As associações encontradas foram consideradas significantes quando $p \leq 0.05$.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Classificação histológica dos tumores

Dos 80 tumores incluídos no estudo, 90% (n=72) foram classificados como malignos e 10% (n=8) como benignos. Entre os tumores benignos o tumor misto (5%; n= 4) foi o mais comum e entre os malignos o carcinoma em tumor misto grau I (32,5%; n=26) foi o que apresentou mais ocorrências e o tipo histológico com menor frequência foi o fibrossarcoma mamário (1,25%; n=1) (Tabela 4).

A maioria dos autores afirma que cerca de 50% dos tumores mamários em cadelas são benignos (MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001). Entretanto, no presente trabalho observou-se uma superioridade na frequência das neoplasias malignas (90%), corroborando os achados de Zuccari et al. (2002) que encontrou 86% de tumores malignos, Queiroga e Lopes (2002) 63%, Oliveira et al. (2003) 73,38%, Queiroga (2005) 60% , Oliveira Filho (2010) 71,90% de tumores malignos.

O carcinoma em tumor misto foi o tumor maligno com maior frequência. Outros estudos relatam maior frequência de carcinomas, porém há uma variedade de tipos de carcinomas relatados, Carvalho (2009) relata a presença do carcinoma complexo como o mais frequente (52,78%), Queiroga e Lopes (2002) o carcinoma ductal (38,9%), Zuccari et al (2002) encontrou carcinoma tubulopapilífero (41%), Oliveira et al. (2003) o adenocarcinoma (16,5%), Zuccari et al. (2005) o carcinoma tubulopapilífero (41%), Queiroga (2005) carcinoma tubulopapilífero (35,89%), Burini (2007) carcinoma simples (70%), Tersian et al. (2007) carcinoma tubulopapilífero (41%), Figueiroa (2009) carcinoma complexo (68,18%), Carvalho (2009) carcinoma complexo (52,78%), Oliveira Filho (2010) carcinoma simples (29,1%). Os carcinomas de mama são as neoplasias mais frequentes em fêmeas caninas e isto ocorre devido à heterogeneidade desta neoplasia. Pode-se observar neste tipo tumoral, diversas formas clínicas, bem como características histopatológicas, que resultam em diferentes evoluções clínicas da doença (MISDORP, 2002).

Nas análises feitas neste trabalho, o tumor misto benigno foi a neoplasia benigna mais frequente, semelhante ao relatado por Carvalho (2009) e Queiroga e Lopes (2002), mas diferente dos estudos de Figueiras (2003) que

encontrou o fibroadenoma e dos estudos de Oliveira et al. (2003), Queiroga (2005) e Oliveira Filho (2010) que relataram adenoma como o mais comum.

Tabela 4. Classificação histológica dos tumores espontâneos de mama de cadelas, Uberlândia, 2012.

Tipo Histológico	N	%
Benignos		
Tumor misto benigno	04	5
Adenoma complexo	02	2,5
Adenoma simples	02	2,5
TOTAL	08	10%
Malignos		
Carcinoma em tumor misto I	26	32,5
Carcinoma em tumor misto II	13	16,25
Carcinoma simples tubulopapilar	03	3,75
Carcinoma simples papilar I	02	2,50
Carcinoma simples papilar II	02	2,5
Carcinoma simples tubular II	08	10
Carcinoma simples tubular III	01	1,25
Carcinoma tubular II	03	3,75
Carcinoma papilar II	01	1,25
Carcinoma papilar III	01	1,25
Carcinoma “in situ”	03	3,75
Carcinoma complexo I	05	6,25
Carcinoma solido II	02	2,5
Carcinoma túbulo papilar I	01	1,25
Fibrossarcoma	01	1,25
TOTAL	72	90%

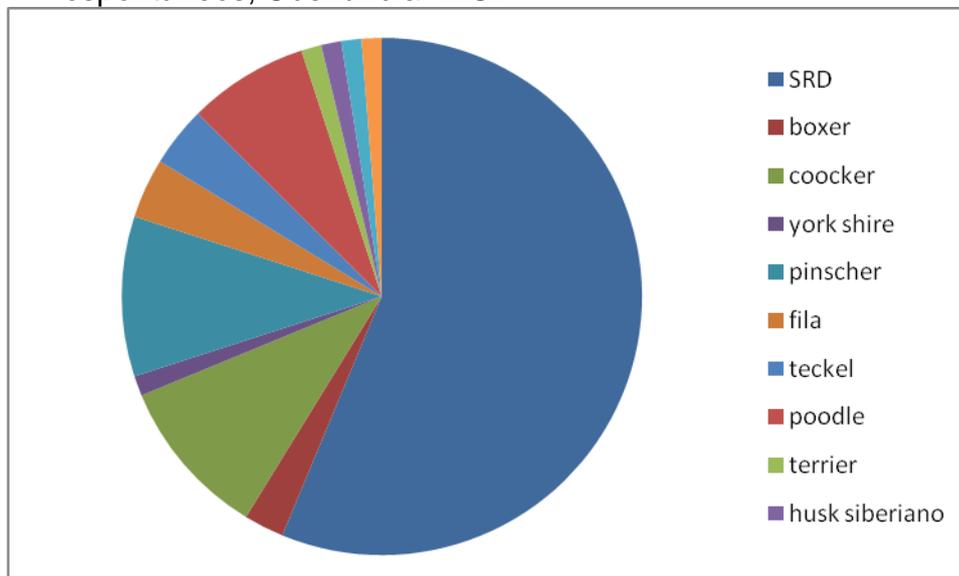
Na literatura pode-se encontrar uma disparidade de dados em estudos com o objetivo de conhecer a frequência e epidemiologia dos tumores mamários nas cadelas. Segundo Cassali (2000) isto pode ser explicado, em parte, pela dificuldade encontrada em proceder ao diagnóstico diferencial entre neoplasias benignas e malignas, possivelmente devido à falta de uniformidade nos critérios de distinção entre os tipos de lesões.

Variáveis clínico-patológicas

Foram utilizados fragmentos de 80 tumores mamários de cadelas neste estudo e 45% destes eram de cadelas sem raça definida (SRD) e, entre as

cadelas de raça, as mais comuns foram cocker, pinscher (10%) e poodle (7,5%) (Figura 2).

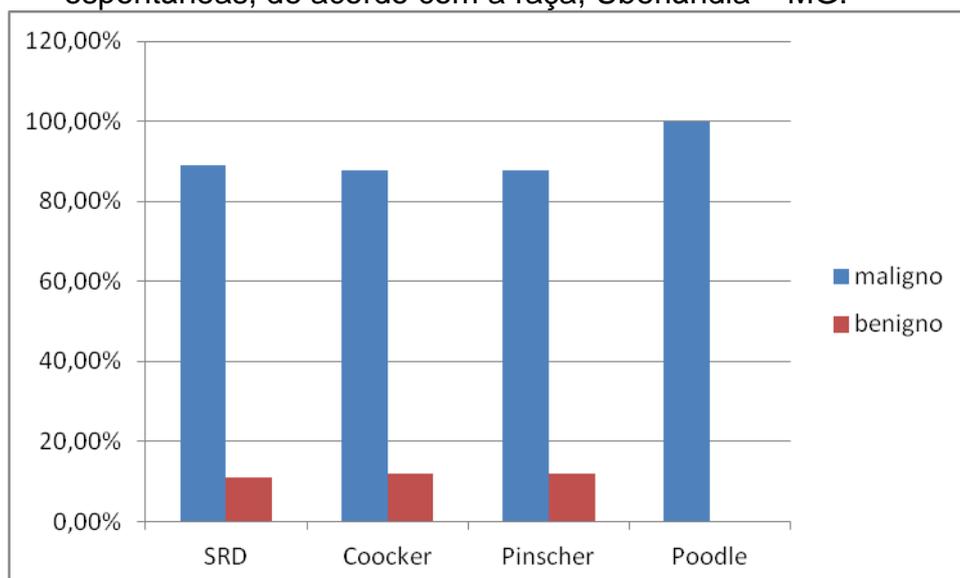
Figura 2. Raças mais frequentemente acometidas por tumores mamários espontâneos, Uberlândia- MG.



Entre as cadelas SRD, 88,89% dos tumores eram malignos e 11,11% benignos; já as raças puras cocker e pinscher possuíam 87,5% (n=07) de tumores malignos e 12,5% (n=1) benigno; na raça poodle (n=6) 100% eram malignos e não houve cadelas da raça poodle com tumores benignos (Figura 3).

A maior frequência de animais com tumores mamários foi entre cadelas SRD e deve-se, provavelmente, ao fato desses animais representarem a maior população de cães atendidos no município de Uberlândia; e esses resultados foram semelhantes aos observados por Daleck et al. (1998), Burini (2007) e Carvalho (2009). Entre os cães de raça pura, pinscher e poodle foram as mais comuns, semelhantes ao estudo de Oliveira Filho (2010) que encontrou entre a raça poodle 23,71% e com 6,64% a raça pinscher. Carvallho (2009) e Oliveira Filho (2010) observaram resultados semelhantes aos do presente estudo, com 10,5% e 11,72% de animais da raça cocker acometidos por neoplasia mamária.

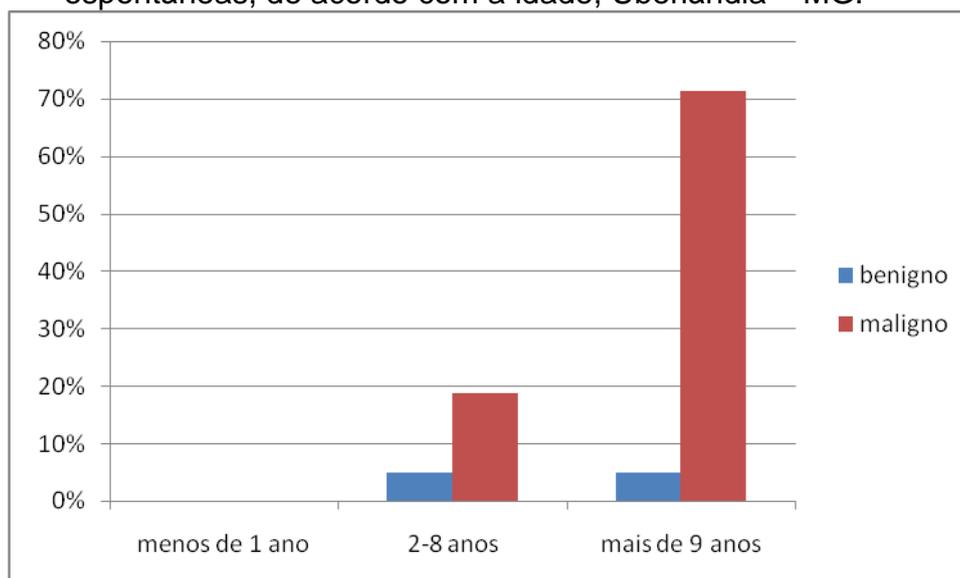
Figura 3. Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a raça, Uberlândia – MG.



Segundo a faixa etária, 19 cadelas (23,75%) tinham entre dois a oito anos de idade e 61 (76,25%) eram cadelas que tinham mais de oito anos de idade. Não foram observadas cadelas com idade inferior a um ano com tumores de mama. Dentro da faixa etária de dois a oito anos, 15 cadelas (18,75%) possuíam tumores malignos e quatro (5%) benignos. Entre as cadelas com mais de oito anos, 57 (71,25%) eram portadoras de tumores malignos e quatro (5%) eram benignos (Figura 4). A maioria das cadelas tinha mais de nove anos de idade, demonstrando maior incidência entre cadelas de meia idade e idosas. Queiroga e Lopes (2002); Oliveira et al (2003) e Oliveira Filho (2010) observaram maior ocorrência de neoplasias mamárias entre cadelas maiores de 9 anos.

Houve baixa incidência entre cadelas jovens e nenhum caso de tumores mamários em filhotes, como no estudo de Oliveira Filho (2010), mostrando ser de extrema raridade.

Figura 4. Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a idade, Uberlândia – MG.



Na avaliação da influência da administração de hormônios como contraceptivos na ocorrência de tumores mamários, 61 cadelas (76,25%) não possuíam histórico de administração de hormônios contraceptivos e 19 (23,75%) utilizaram hormônios como método contraceptivo pelo menos uma vez durante a vida. Dentre as 19 cadelas que possuíam histórico, 17 (89,47%) possuíam tumores malignos e duas (10,53%) benignos. Oliveira Filho (2010) observou que entre as cadelas de utilizavam hormônios como método contraceptivo a maioria delas apresentavam tumores malignos, enquanto que Oliveira et al. (2003) observou entre cadelas com uso de contraceptivo a presença de tumores benignos.

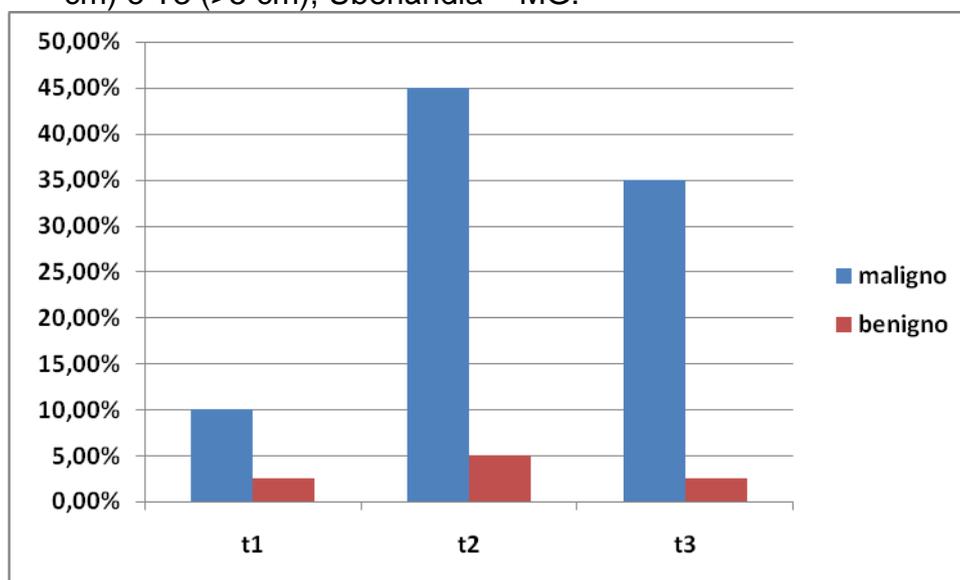
Ao avaliar a relação de cadelas com o uso contraceptivo de hormônios com a origem tumoral benigna ou maligna não observou-se correlação estatística ($p > 0,05$).

A pseudociese foi observada em 24 (30%) cadelas, sendo que 21 destas cadelas (87,5%) apresentaram tumores malignos e três (12,5%) benignos. Não foi observada pseudociese pelos proprietários em 56 cadelas (70%) avaliadas neste experimento. Verificou-se alta incidência de cadelas com pseudociese e com presença de tumores malignos, semelhante aos dados de Oliveira et al (2003) que observou 72,3% de cadelas com neoplasia maligna e Oliveira Filho (2010) observou 63,16% de tumores malignos e histórico de pseudociese. A relação entre as neoplasias mamárias e a pseudociese é controversa; segundo

Burini (2007) a pseudociese é um fenômeno normal do ciclo estral, mas em algumas cadelas podem estimular o aparecimento de sinais clínicos, com severas manifestações da pseudociese (como produção láctea exagerada e mudança de comportamento), podendo apresentar reposta exacerbadas a progesterona predispondo a formação de tumores mamários.

Ao avaliar o tamanho dos tumores, dez cadelas (12,5%) apresentaram tumores menores que três centímetros (T_1), sendo que destes oito (10%) eram malignos e dois (2,5%) benignos. Tumores de três a cinco centímetros (T_2) foram apresentados por 40 cadelas (50%), sendo que 36 (45%) eram malignos e quatro (5%) benignos. Trinta cadelas (37,5%) apresentaram tumores maiores que cinco centímetros (T_3), sendo 28 (35%) malignos e dois (2,5%) benignos (Figura 5). Portanto, a maioria dos tumores malignos observados foram incluídos na categoria T_2 e T_3 . Entretanto, na avaliação da correlação do tamanho do tumor com malignidade ou benignidade, neste trabalho não houve diferença estatística entre estas variáveis.

Figura 5. Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com o tamanho T_1 (<3 cm), T_2 (entre 3 a 5 cm) e T_3 (>5 cm), Uberlândia – MG.



Resultados semelhantes foram observados por Queiroga e Lopes (2002); e Burini (2007) que encontraram 41,7% e 37,5% respectivamente de tumores com 3-5 cm (T_2). Já Carvalho (2009), Queiroga (2005) e Oliveira Filho (2010) observaram a maioria de tumores com tamanho entre 1-3 cm (T_1), com

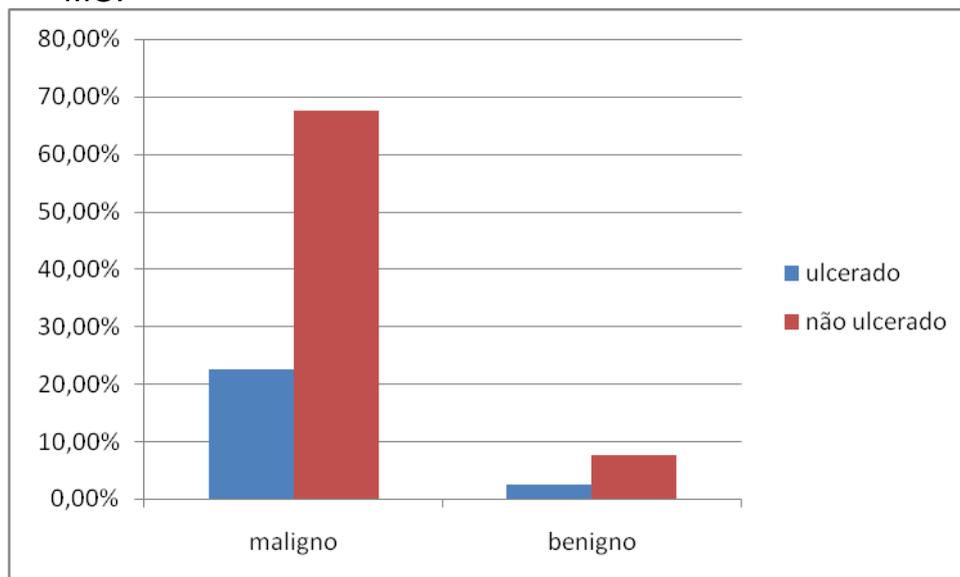
45,6%, 49% e 49,42% respectivamente. E Oliveira et al. (2003) encontrou 44,3% de tumores com mais de 5 cm (T₃).

As dimensões observadas, para as neoplasias benignas e malignas, podem ser explicadas pela velocidade de crescimento tumoral. Em geral, as neoplasias benignas tendem a crescer lentamente ao longo de um período, como massas nodulares, bem circunscritas. Entretanto, as neoplasias malignas variam amplamente em sua velocidade de crescimento. Algumas delas têm crescimento extremamente lento, mas outras, caso não sejam tratadas, rapidamente atingem proporções gigantescas (JONES et al., 2000). Portanto, pacientes com tumores maiores apresentam prognóstico significativamente desfavorável, estando também associados a uma maior incidência de metástases (BURINI, 2007).

Com relação à apresentação de aspecto ulcerado, 60 cadelas (75%) apresentaram tumores sem ulceração, sendo que destes 54 (90%) eram malignos e seis (10%) benignos. Já 20 animais (25%) possuíam tumores com ulceração e destes 18 (90%) eram malignos e dois (10%) benignos (Figura 6). Foram observados poucos casos de tumores com ulceração cutânea, sendo semelhante aos dados de Queiroga e Lopes (2002) que encontraram 17,5% de tumores ulcerados e malignos.

A ulceração cutânea não foi exclusiva dos tumores malignos no presente estudo, semelhante aos dados de Oliveira et al. (2003) que observaram 72,7% de ulceração em tumores malignos e 27,3% ulceração em tumores benignos e Oliveira Filho (2010) observou 89,28% de ulceração em tumores malignos e 10,72% em tumores benignos. Entretanto, Queiroga e Lopes (2002) verificaram a ocorrência de ulceração apenas em tumores malignos. A ulceração cutânea, segundo Burini (2007), ocorre com relativa frequência nos tumores mamários e está associado significativamente com a malignidade, porém, no presente estudo, na avaliação da correlação da ulceração do tumor com malignidade ou benignidade, neste trabalho não houve diferença estatística entre estas variáveis.

Figura 6. Percentual de cães com neoplasias mamárias malignas e benignas espontâneas, de acordo com a presença de ulceração, Uberlândia – MG.



Infiltrados de linfócitos T (CD3)

Entre os tumores malignos, 16,64% apresentaram marcação positiva em mais de 50% do campo (++++), 38,89% apresentaram marcação positiva entre 25 a 50% do campo (+++), 34,72% apresentaram marcação positiva em até 25% do campo (++) e 2,78% tiveram marcação de 10% do campo (+). Apenas 6,94% dos tumores foram negativos, ou seja, não ocorreu imunorreatividade. Já entre os tumores benignos, 25% foram negativos e 25% apresentaram marcação positiva em mais de 50% do campo (++++), 25% apresentaram marcação positiva entre 25 a 50% do campo (+++) (Tabela 5) (Figura 7). A marcação foi observada no citoplasma dos linfócitos T, de forma homogênea entre os linfócitos presentes na neoplasia (Figura 8 e 9). A marcação foi encontrada tanto na porção central quanto na periferia do tumor, não apresentando padrão definido de distribuição.

Carvalho (2009) observou marcação de CD3 no citoplasma ou na membrana citoplasmática dos linfócitos T, sendo que a marcação também foi de forma homogênea e ocorrendo sua maioria em os tumores benignos, com significância estatística em comparação com os tumores malignos e ainda observou marcação de linfócitos T na periferia de tumores benignos. Hussein e Hassan (2005) relataram que houve aumento no infiltrado mononuclear

inflamatório, predominantemente de linfócito T, quando comparou-se a mama normal e diversos tipos de tumores malignos. Estes autores observaram ainda maior marcação de CD3, sendo que a maior marcação foi no estroma tumoral.

Silveira (2009) observou marcação de CD3 em linfócitos T localizados intra e peritumorais, próximos de trabéculas de tecido conjuntivo e a maior marcação foi nos tumores malignos.

Figura 7. Percentual e intensidade de marcação de CD3 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

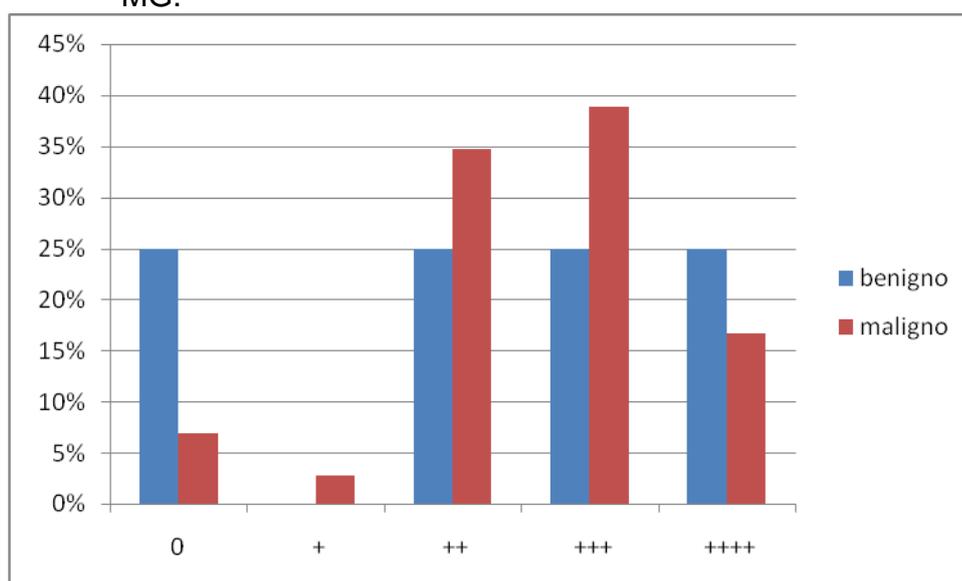


Tabela 5. Percentual e intensidade de marcação de CD3 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

CD3	Tumores Benignos Frq (%)	Tumores Malignos Frq (%)
-	02 (25%) ^a	05 (6,94%) ^a
+	00 ^a	02 (2,78%) ^a
++	02 (25%) ^a	25 (34,72%) ^a
+++	02 (25%) ^a	28 (38,89%) ^a
++++	02 (25%) ^a	12 (16,67%) ^a
Total	08 (100%)^a	72 (100%)^a

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre tumores malignos e benignos ($p > 0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

Entre os tumores benignos, o tumor misto benigno foi o que apresentou maior marcação para linfócitos T (++++). E entre os malignos foram o carcinoma túbulo papilar (++++), carcinoma simples túbulo papilar (++++) e fibrossarcoma (++++). Hussein e Hassan (2005), Carvalho (2009) e Silveira

(2009) relataram os carcinomas com maior infiltração para linfócitos T, sendo os tipos ductal e “in situ” citado por Hussein e Hassan (2005), carcinoma sólido por Carvalho (2009), carcinosarcoma por Silveira (2009). A imunorreatividade linfocitária ocorreu nos tumores malignos e benignos, com variação na intensidade de marcação, porém sem associação entre intensidade de marcação e malignidade e benignidade ($p>0,05$).

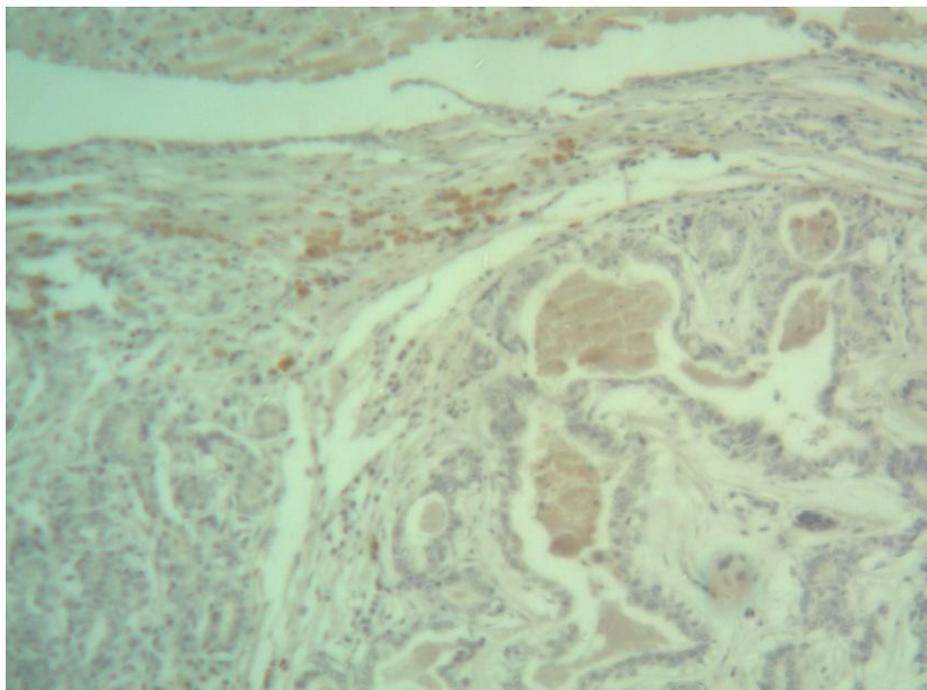


Figura 8. Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto I, imunorreativo para marcação de CD3. Aumento de 10x. Uberlândia-MG.

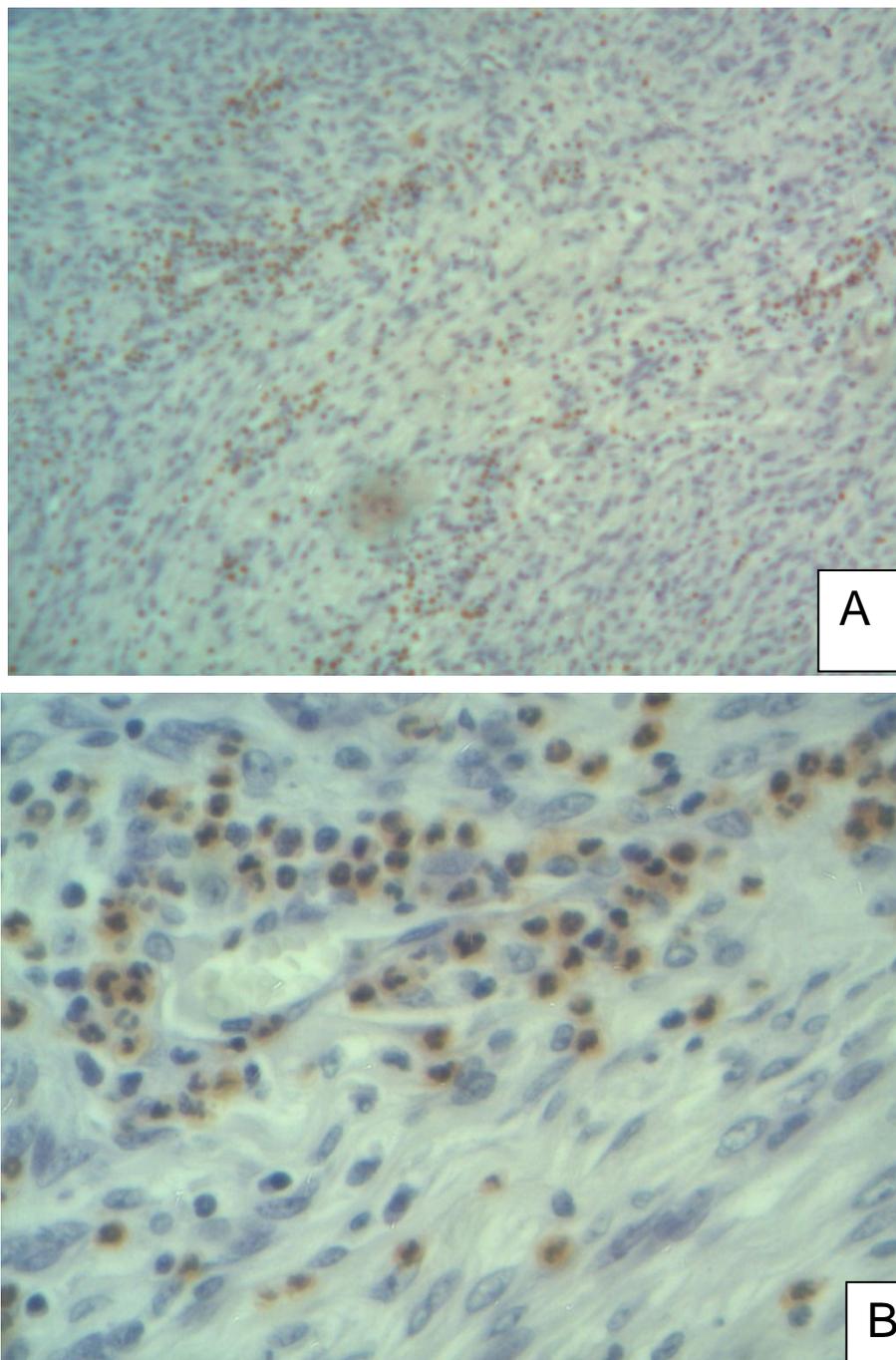


Figura 9. Fotomicrografia de carcinoma complexo, notar marcação do citoplasma dos linfócitos T no infiltrado inflamatório. Aumento 10 (A) e 40X (B). Uberlândia-MG.

Silveira (2009) também relatou intensa marcação para CD3 no carcinoma túbulo papilar, porém, não observou diferença estatística entre a imunorreatividade dos diferentes tipos histológicos. Ribeiro (2012) também não observou diferença estatística entre a imunorreatividade dos diferentes tipos histológicos, assim como no presente estudo. Já Estrela-Lima et al. (2010) observou maior infiltrado inflamatório linfocitário em carcinomas de tumores

mistos de cadelas sem metástases, quando comparado com cadelas com carcinomas em tumores mistos com metástases.

Carvalho (2009) mostrou que a contagem de linfócitos T foi maior nos tumores benignos. Por outro lado Silveira (2009) relatou maior contagem em malignos, assim como no presente estudo, com exceção do tumor misto benigno que apresentou intensa marcação (++++).

Ribeiro (2012) encontrou moderado infiltrado de linfócitos T em carcinomas em tumor misto benigno, mostrando também incidência entre os tumores benignos como presente estudo. Hussein et al. (2009), verificaram que a presença de infiltrado de células imunes nas lesões benignas sugere que estas apresentam imunogenicidade suficiente para recrutar as células do sistema imunitário. Pérez et al. (1999) sugere que a expressão desta molécula em tumores benignos pode ser um intento de melhorar a resposta imune, e Natali et al. (1993) relatam que tumores de glândula mamária na mulher e a presença dessa molécula está relacionada a um prognóstico favorável.

Estrela-Lima et al. (2010) observaram ação protetora de linfócitos T em carcinomas em tumor misto de cadelas sem metástases e em tumores menores de três centímetros. E ainda observou que cadelas com discreto e moderado infiltrado linfocitário apresentaram maior taxa de sobrevivência.

Entre os tumores malignos o carcinoma sólido foi o que apresentou infiltrado linfocitário com maior intensidade segundo Carvalho (2009). Silveira (2009) relatou que os tipos histológicos mais agressivos e com pior prognóstico foram os que apresentaram valores de linfócitos T superiores, e ainda verificou aumento dos linfócitos T em tumores com maior diâmetro. No presente estudo tumores malignos apresentaram intensa infiltração inflamatória, porém, semelhantes em os todos os tipos de marcadores, não houve predominância de apenas um marcador, diferindo dos estudos acima.

Estrela-Lima et al. (2010) mostraram associação de metástases em cadelas com tumores mamários com intenso infiltrado linfocitário e menor taxa de sobrevida. Ribeiro (2012) relatou que o infiltrado aumenta com a malignidade tumoral.

Carvalho (2009) verificou que os linfócitos T tendem a contactar intimamente com as células cancerígenas e, por vezes, acumulam-se ao redor de paredes das veias que drenam o tumor.

Para linfócitos T houve grande discrepância de marcação entre os tumores malignos, e segundo Marsigliante et al. (1999) a presença de um tumor maligno não implica sempre um fluxo de grande quantidade de linfócitos, uma vez que, em alguns tumores o número de linfócitos T são escassos. Morri et al. (2008) relatam que as respostas inflamatórias mediadas pelos linfócitos T, estão associada com pobre diferenciação do tumor e progressão maligna da doença.

A presença de infiltrados de linfócitos T em tumores mamários pode ter papel duplo, participando na resposta imunitária específica para o tumor, controlando ou induzindo a progressão tumoral (ESTRELA-LIMA et al., 2010). Assim como a presença de infiltrado de linfócitos T e B na neoplasia sugere a participação de imunidade mediada por células e imunidade humoral na carcinogênese mamária (HUSSEIN E HASSAN, 2005).

Infiltrados de linfócitos B (IgG)

Nos tumores malignos 20,83% apresentaram marcação em mais de 50% do campo (++++), 40,28% apresentaram 25 a 50% de marcação do campo (+++), 26,39% apresentaram 10 a 25% de marcação (++) e 5,56% apresentaram 10% de marcação (+) (Tabela 7 e Figura 11). E não ocorreu imunorreatividade em 6,94% dos tumores. Os tumores com a média maior de marcação pelo anticorpo IgG foram: carcinoma em tumor misto I (++++), carcinoma simples papilar I (++++) e carcinoma túbulo papilar I(++++).

Nos tumores benignos, 25% apresentaram marcação em mais de 50% do campo (++++), 12,10% apresentaram 25 a 50% de marcação do campo (+++), 37,5% apresentaram 10 a 25% de marcação (++) e 25% foram negativos (Tabela 6 e Figura 11). Entre os tumores benignos ocorreu moderada marcação (++) no tumor misto benigno e adenoma complexo. Ao verificar diferença de marcação entre os tumores malignos e benignos com imunorreatividade para IgG não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$).

A marcação foi observada no citoplasma dos linfócitos, de forma homogênea e a marcação foi encontrada tanto na porção central quanto na periferia do tumor (Figura 10). Silveira (2009) utilizando marcador CD79 α para linfócito B, observou marcação localizada ao redor das células tumorais, sendo

que a imunomarcção foi homogênea. e os tumores com maior imunorreatividade o carcinoma sólido e carcinoma tubulopapilares.

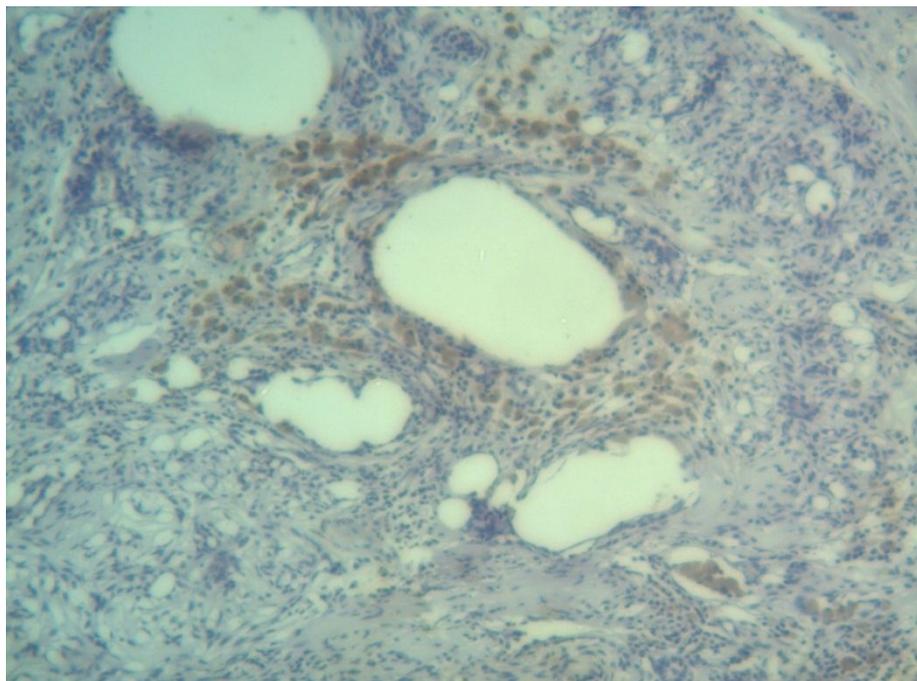


Figura 10. Fotomicrografia de imunomarcção para IgG em carcinoma complexo. Aumento de 10x. Uberlândia-MG.

Figura 11. Percentual e intensidade de marcação de IgG em tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia – MG.

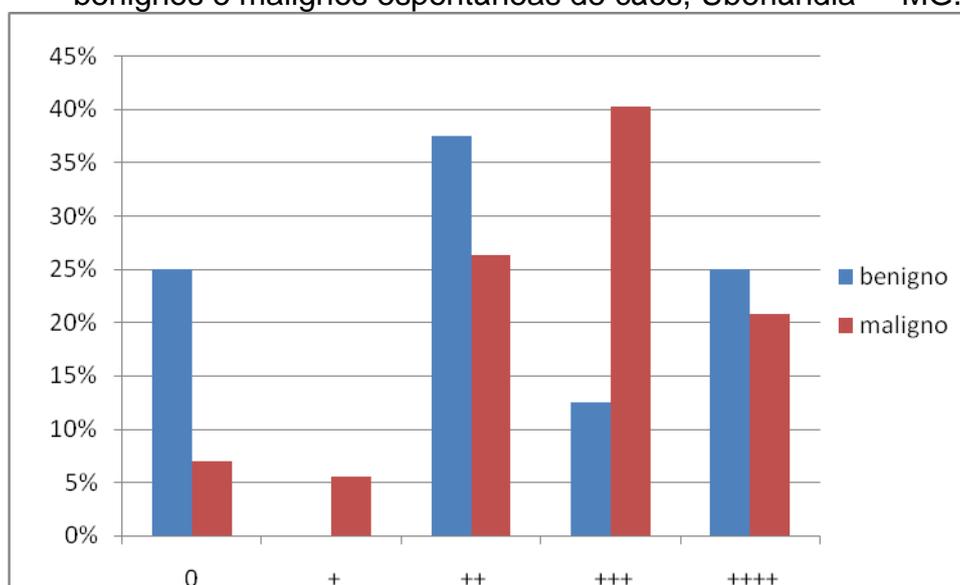


Tabela 6. Percentual e intensidade de marcação de IgG em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

IgG	Tumores Benignos Frq (%)	Tumores Malignos Frq (%)
-	02 (25%) ^{a*}	05 (6,94%) ^a
+	00 ^a	04 (5,56%) ^a
++	03(37,5%) ^a	19 (26,39%) ^a
+++	01 (12,50%) ^a	29 (40,28%) ^a
++++	02 (25%) ^a	15 (20,83%) ^a
Total	08 (100%)^a	72 (100%)^a

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre tumores malignos e benignos ($p>0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

A imunorreatividade para linfócitos B ocorreu principalmente entre os tumores malignos. Dell Castilho (2002) observou que cerca de 65,1% das neoplasias mamárias caninas malignas analisadas apresentavam linfócitos B em seu infiltrado. Estrela- Lima et al. (2010) observaram infiltrado de linfócitos B em carcinomas de tumor misto de cadelas com metástases. Entretanto Silveira (2009) relata maior resposta de linfócitos B no carcinoma sólido.

Silveira (2009) e Dell Castilho (2002) relatam que a presença de linfócitos B nas neoplasias benignas e malignas nos leva a pensar na existência de uma resposta humoral e não somente celular frente aos tumores. Porém Abbas et al. (2004) relatam a escassez de estudos sobre a relevância destas células na resposta imune local das neoplasias mamárias, além de existir pouca evidência da efetividade da imunidade humoral em relação aos tumores. Dell Castilho (2002) associa a existência dessas células a um prognóstico negativo já que a resposta Th2 inibe a resposta Th1 responsável pelo controle da proliferação tumoral.

Denardo et al. (2007) sugerem que a ativação aguda de linfócitos B podem ter um papel na eliminação precoce de células neoplásicas. Hussein e Hassan (2005) sugerem que a presença de linfócitos B serve como uma via de sinalização e indica resposta dos anticorpos na carcinogênese mamária.

Na literatura existem poucas evidências da existência de imunidade humoral efetiva contra tumores, mas a infiltração plasmocítica é relatada entre os carcinomas mamários indiferenciados de cadelas (MISDORP et al., 1999).

Os linfócitos B apresentam como principal função a produção de anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares e se diferenciam em células secretoras de anticorpos (plasmócitos), funcionando assim, como

mediadores da imunidade humoral, via secreção de imunoglobulinas antígeno-específicas (ABBAS et al. 2004). Sabe-se que a ativação aguda de células B possui importância na destruição de células neoplásicas jovens ou na regressão espontânea de tumores, mediada por imunoglobulinas. Porém, estudos indicam que a ativação crônica deste tipo celular pode potencializar o desenvolvimento do carcinoma mamário (DENARDO et al., 2007).

Infiltrados de macrófagos (MAC 385 e CD68)

A marcação molecular para anticorpo CD68 foi observado nos tumores malignos, com 6,94% dos tumores com marcação até 10% do campo (+), 30,56% com marcação entre 10 a 25% do campo (++), 34,72% com marcação de 25 a 50% do campo (+++) e 16,67% marcação com mais de 50% do campo (++++). Ausência de marcação foi observada em 11,11% dos tumores (Tabela 7 e Figura 12).

Já entre os tumores benignos, 25% não tiveram marcação e 25% tiveram marcação de 10 a 25% (++), 25 a 50% (+++) e mais de 50% da marcação do campo (++++).

A marcação molecular de MAC 385 nos tumores malignos apresentou 6,94% dos tumores sem imunorreatividade, 4,17% tiveram 10% de marcação do campo (+), 31,95% marcação de 10 a 25% do campo (++), 38,89% marcação de 25 a 50% do campo (+++) e 18,05% da marcação de mais de 50% do campo (++++). E entre os tumores benignos 25% não tiveram marcação e 25% tiveram marcação de 10 a 25% (++), 25 a 50% (+++) e mais de 50% da marcação do campo (++++) (Tabela 8 e Figura13).

Os tumores carcinoma simples túbulo papilar, carcinoma túbulo papilar I tiveram forte marcação (++++) para CD68 e MAC 385 e os tumores mistos benignos tiveram forte marcação (++++) para o CD68 e MAC 385.

Imunorreatividade para ambos marcadores ocorreu tanto nos tumores malignos quanto nos benignos, com variação na intensidade de marcação, porém sem associação entre intensidade de marcação e malignidade e benignidade ($p>0,05$) (Figura 14 e 15).

A intensidade de imunomarcção dos macrófagos foi homogênea para cada tipo de marcador, sendo a distribuição das células marcadas semelhante no estroma e tumor.

Silveira (2009) utilizando o marcador MAC 385 relatou macrófagos imunorreativos ao redor do infiltrado inflamatório, com fraca marcação no citoplasma das células. A maior intensidade de marcação foi no tumor carcinoma túbulo papilar, sendo que o presente estudo foi semelhante com esse dado.

Figura 12. Percentual e intensidade de marcação de CD68 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

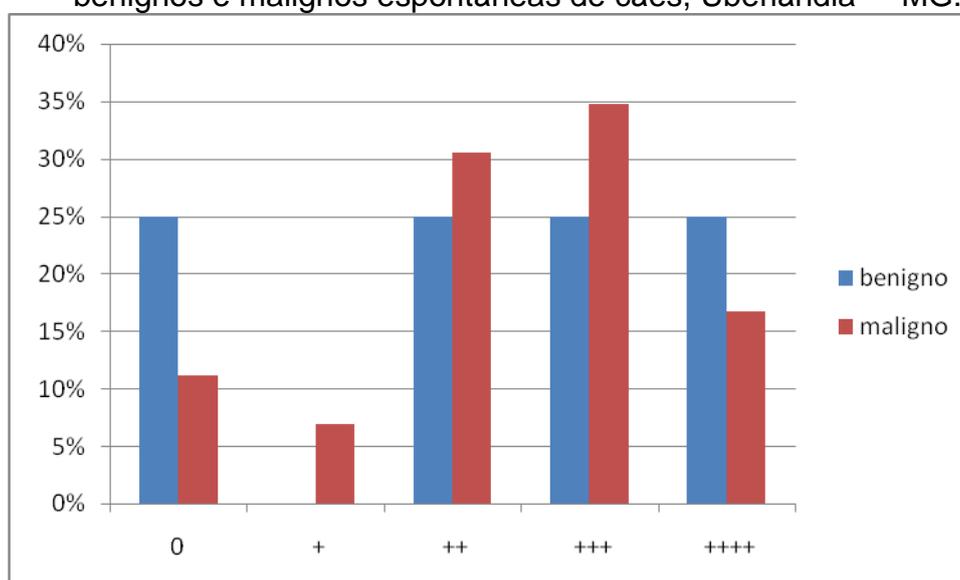


Tabela 7. Percentual e intensidade de marcação de CD68 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

CD68	Tumores Benignos Frq (%)	Tumores Malignos Frq (%)
-	02 (25%) ^{a*}	08 (11,11%) ^a
+	00 ^a	05 (6,94%) ^a
++	02 (25%) ^a	22 (30,56%) ^a
+++	02 (25%) ^a	25 (34,72%) ^a
++++	02 (25%) ^a	12 (16,67%) ^a
Total	08 (100%)^a	72 (100%)^a

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre tumores malignos e benignos ($p > 0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

Figura 13. Percentual e intensidade de marcação de MAC 385 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

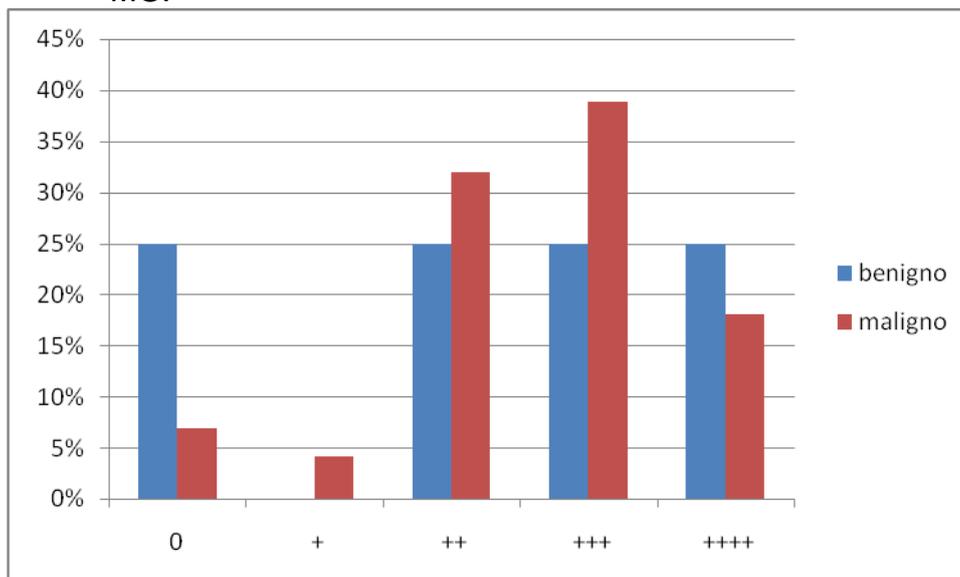


Tabela 8. Percentual e intensidade de marcação de MAC 385 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

MAC 385	Tumores Benignos Frq (%)	Tumores Malignos Frq (%)
-	02 (25%) ^{a*}	05 (6,94%) ^a
+	00 ^a	03 (4,17%) ^a
++	02(25%) ^a	23 (31,95%) ^a
+++	02 (25%) ^a	28 (38,89%) ^a
++++	02 (25%) ^a	13 (18,05%) ^a
Total	08 (100%)	72 (100%)

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre tumores malignos e benignos ($p > 0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

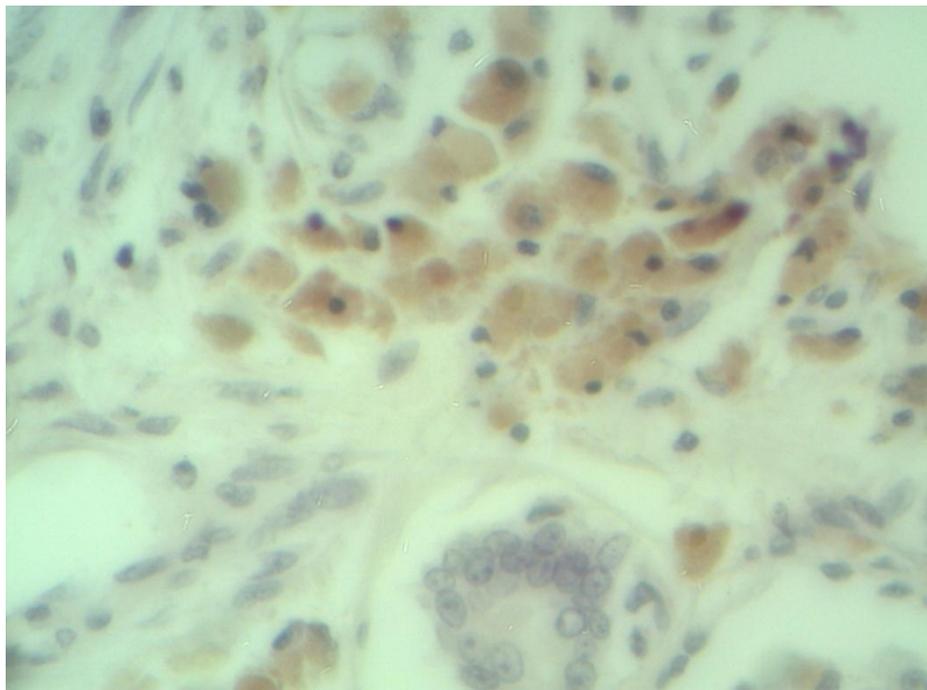


Figura 14. Fotomicrografia de imunomarcção de CD68 em carcinoma em tumor misto. Aumento de 40x. Uberlândia-MG.

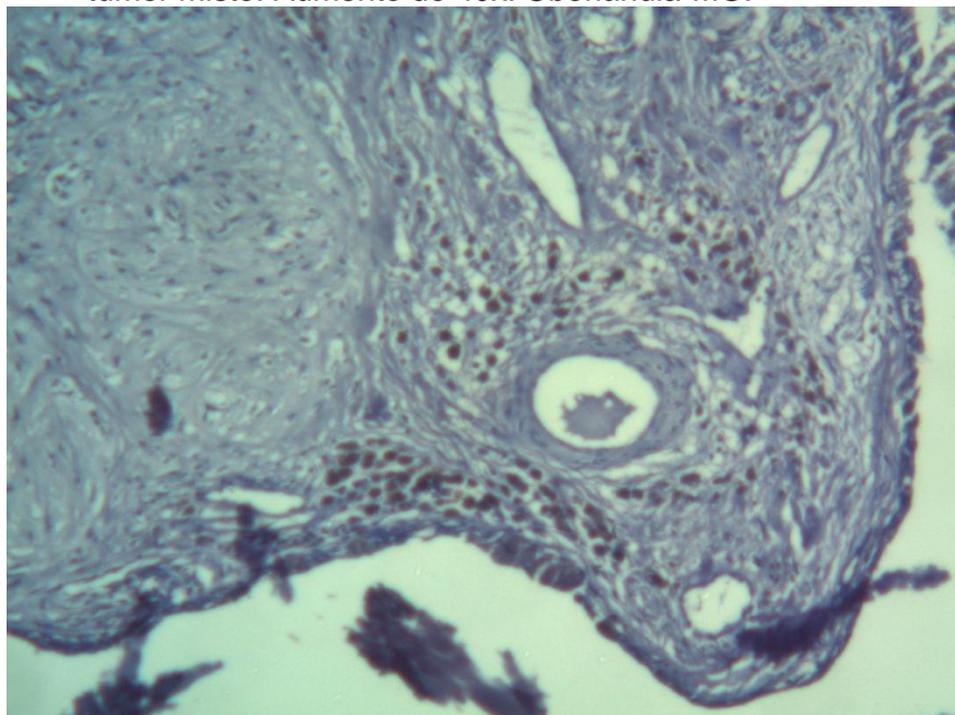


Figura 15. Fotomicrografia de imunomarcção de MAC 385 em carcinoma em tumor misto, Uberlândia-MG. Aumento de 10x.

Em relação aos macrófagos, segundo Ribeiro (2012) o infiltrado de macrófagos nos tumores mamários foi o segundo infiltrado mais comum, no

presente estudo o macrófago foi o terceiro infiltrado mais comum, os infiltrados de linfócitos T e B foram os infiltrados predominantes.

Os macrófagos são células frequentemente encontradas infiltrando tumores, porém tem um papel controverso, podendo ter ação positiva ou negativa (SILVEIRA, 2009). Os macrófagos são capazes de reconhecer e lisar células tumorais, incluindo aquelas que são resistentes a drogas citostáticas, apresentando os antígenos tumorais às células citotóxicas (OLIVEIRA, 2008).

Silveira (2009) relata pouca intensidade de infiltrado de macrófagos em seu estudo. No presente estudo foram utilizados dois marcadores para avaliação dos macrófagos (CD68 e MAC 385) e com isso pode-se observar maior marcação entre os tumores. Entretanto, na literatura há poucos estudos sobre a frequência e característica de macrófagos infiltrados em tumores de mama, novos estudos utilizando outros marcadores de macrófagos são necessários para confirmar o papel dos macrófagos em tumores mamários de cadela.

Células que expressam MHC II (TAL IB5)

Entre os tumores malignos, 8,33% não tiveram imunomarcação, 2,78% marcação de 10% do campo (+), 29,17% marcação de 10 a 25% do campo (++) , 40,28% marcação de 25 a 50% do campo e 19,44% marcação de mais de 50% do campo. Entre os tumores benignos 25% foram negativos, 37,5% tiveram marcação de 10 a 25% (++) , 12,5% marcação de 25 a 50% do campo (+++) e 19,44% marcação de mais de 50% do campo (++++) (Tabela 9 e Figura 16).

Os tumores carcinoma simples túbulo papilar, carcinoma túbulo papilar I e fibrossarcoma foram os tumores com maior marcação de MHC II (++++). E para os tumores benignos marcação (+++) para adenoma complexo e tumor misto benigno, sendo que o adenoma simples não apresentou marcação.

A marcação de TAL IB5 ocorreu tanto nos tumores malignos quanto nos benignos, com exceção do adenoma simples, variação na intensidade de marcação, porém sem associação entre intensidade de marcação e malignidade e benignidade ($p>0,05$).

Em geral as áreas de marcação para TAL IB5 foram disseminadas por todo tumor, ocorrendo principalmente ao redor de vasos e ductos (Figura 17), semelhante ao encontrado por Queiroga (2005). Silveira (2009) observou marcação molecular de MHC II em grande número de células espalhadas por todo tecido tumoral e ainda observou imunomarcação granular no citoplasma de células epiteliais normais e neoplásicas. Este autor relatou maior imunomarcação entre os carcinossarcomas.

Figura 16. Percentual e intensidade de marcação de TAL IB5 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

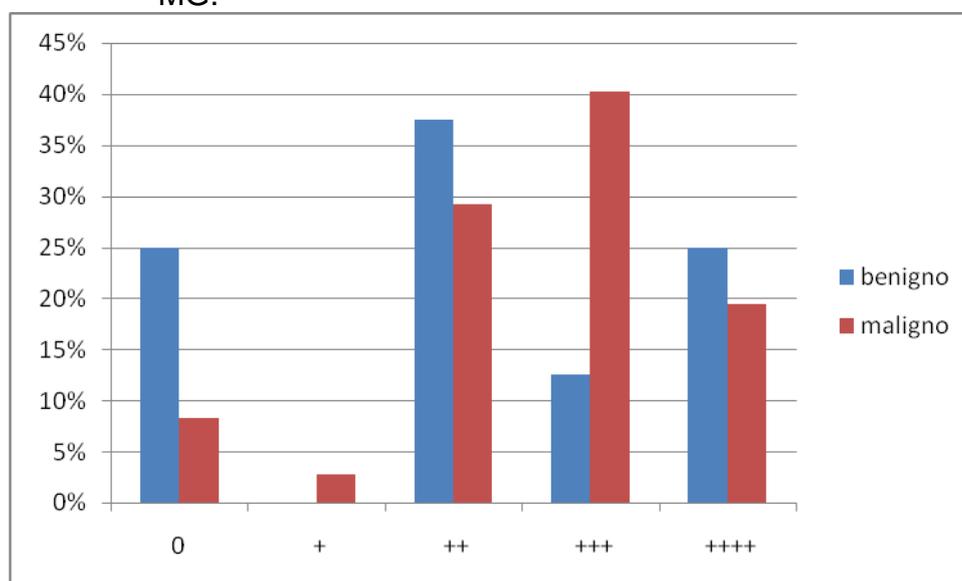


Tabela 9. Percentual e intensidade de marcação de TAL IB5 em tumores benignos e malignos espontâneas de cães, Uberlândia – MG.

TAL IB5	Tumores Benignos Frq (%)	Tumores Malignos Frq (%)
-	02 (25%) ^{a*}	06 (8,33%) ^a
+	00 ^a	02 (2,78%) ^a
++	03(37,5%) ^a	21 (29,17%) ^a
+++	01 (12,50%) ^a	29 (40,28%) ^a
++++	02 (25%) ^a	14 (19,44%) ^a
Total	08 (100%)	72 (100%)

*Letras iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa entre tumores malignos e benignos ($p>0,05$) pelo teste de teste de U de Mann-Whitney.

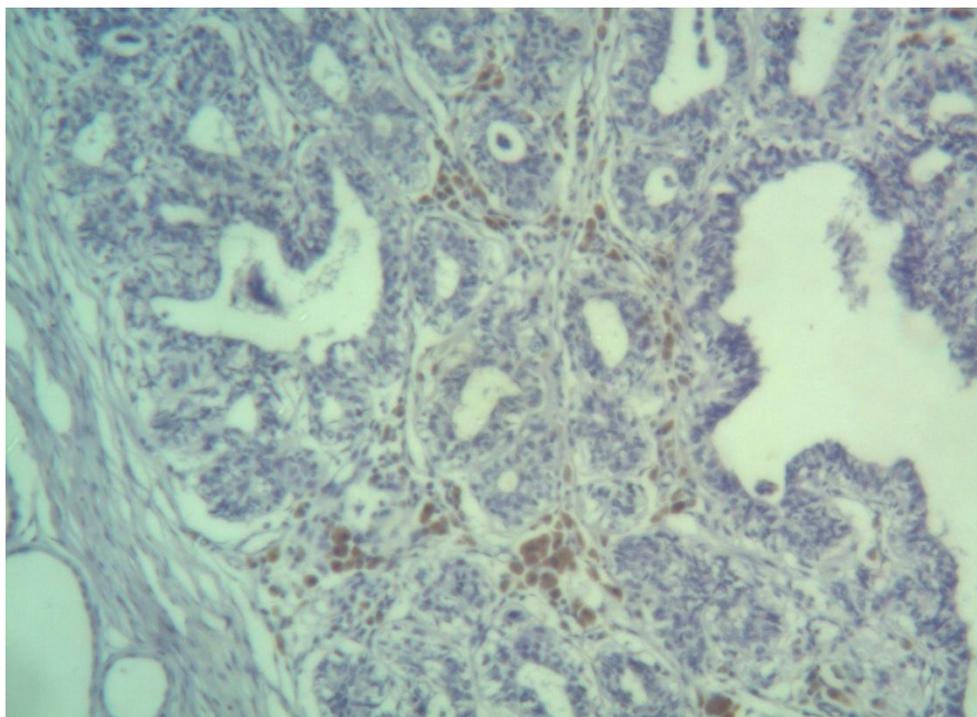


Figura 17. Fotomicrografia de imunomarcação de TAL IB5 em adenoma complexo, Uberlândia-MG. Aumento de 10x.

Hadden (1999) observou que tumores benignos expressaram mais a molécula MHC, quando comparado aos tumores mamários malignos. Já Silveira (2009) observou maior expressão de MHC no carcinossarcoma, mas também observou que tumores mais agressivos perderam a capacidade de expressar MHC.

No presente estudo tumores benignos tiveram expressão moderada de MHC II e tumores malignos observou-se marcação fraca   moderada de MHC II, condizentes com os estudos relatados. E Natali et al. (1993) também relaciona a expressão de MHC II em tumores mamários de mulheres como bom prognóstico. Portanto, tumores que expressam MHC II representam melhor prognóstico e tumores que não ou pouco expressam MHC II estão relacionado a um pior prognóstico.

Para ocorrer o mecanismo que inibe os tumores malignos   necessário   presenç a de antígenos associados ao tumor e moléculas de MHC que são estimuladoras de células T, para a eliminação total do tumor. Mas podem ocorrer mecanismos de escape no sistema imunitário, e havendo a perda desses antígenos e moléculas de MHC e ausência da rejeição imune-mediada ao tumor há resposta inadequada de células T do hospedeiro, que pode ser

devido a anergia dessas células, ocorrendo inibição da resposta imunitária e efeitos citotóxicos contra as células tumorais, explicando assim uma diminuição da resposta contra os tumores mais agressivos (CARVALHO, 2009).

Tabela 10. Média de intensidade de marcação molecular para cada tipo histológico de tumores benignos e malignos espontâneos de cães, Uberlândia – MG.

Tipo Histológico	CD3	CD68	IgG	TAL IB5	MAC 385
carcinoma tumor misto I	+++	++	++++	+++	++
carcinoma tumor misto II	+++	++	+++	++	++
carcinoma simples tubulopapilar	++++	++++	+++	++++	++++
carcinoma simples papilar I	+++	+++	++++	+++	+++
carcinoma simples papilar II	+++	++	++	++	++
carcinoma simples tubular II	+++	+++	++	+++	++
carcinoma simples tubular III	++	++	++	++	+++
carcinoma tubular II	++	++	+++	+++	++
carcinoma papilar I	Negativo	Negativo	++	Negativo	++
carcinoma papilar II	+++	++	++	++	++
carcinoma in situ I	++	+++	++	+++	+++
carcinoma complexo I	+++	++	+++	+++	++
carcinoma sólido II	++	++	++	++	++
carcinoma tubulo papilar	++++	++++	++++	++++	++++
tumor misto benigno	++++	++++	++	+++	+++
adenoma complexo	++	+	+	+++	+++
adenoma simples	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Fibrossarcoma	++++	+++	++	++++	+++

Quando se comparou a marcação pelos cinco marcadores para cada tipo histológico não houve diferença estatística na marcação ($p > 0,05$) (Tabela 10).

É relatado em diversos estudos a variedade de marcação entre as diferentes amostras tumorais, segundo Marsigliante et al (1999) esse fato pode indicar que em tumores malignos não implica sempre um número elevado de células inflamatórias. Rutteman et al (1990) diz que o infiltrado de células inflamatórias nos tumores pode ser relacionado com a imunidade do hospedeiro frente à neoplasia. E relata que o tempo de sobrevivência de cães

com reação inflamatória nos tumores mamários é maior quando comparado a animais com reduzido processo inflamatório associado às neoplasias.

Entretanto, evidência histológica de malignidade, não implica invariavelmente em curso clínico maligno. Por essa razão, fatores de prognóstico são de ótima importância para estimar o risco individual de resultados clínicos desfavoráveis (MISDORP et al., 1999; RUTTEMAN et al., 2001).

Ainda que a resposta imune possa barrar o crescimento das neoplasias mamárias, não proporciona sua completa destruição, por diferentes motivos: debilidade desta, existência de linfócitos T supressores, anticorpos ou imunocomplexos que bloqueiam as células efectoras ou incapacidade para reconhecer antígenos tumorais (BHAN e DESMARAIS, 1983).

Segundo Del Castilho (2002), em geral as cadelas que somente apresentam neoplasias malignas e nenhuma benigna, se caracterizam por apresentar um infiltrado inflamatório muito mais intenso, porém, os animais com mais de três tumores benignos (independente da existência ou não de neoplasias malignas) apresentam valores mais baixos de inflamação. Talvez esse fato se deva a uma falta de reação do sistema imune do hospedeiro ao tumor mamário, deixando de reconhecê-lo como algo estranho ao organismo e diminuindo a resposta imune local (SILVEIRA, 2009).

Vários estudos documentam que os tumores são infiltrados por uma população heterogênea de células imunes. No entanto, até à data, não foi alcançada ainda uma conclusão definitiva relativa à eficácia do mecanismo imune dependente do infiltrado, ou relativa à correlação entre a extensão e tipo de infiltração e a progressão do tumor nos muitos subtipos de tumores mamários (CARVALHO, 2009).

Aspectos de sobrevida

Dos 80 animais, 44 foram selecionados para análise da sobrevida. Destas 44 cadelas, 24 (54,54%) mantiveram-se vivas e 20 (45,45%) cadelas vieram á óbito até o final do experimento (tabela 11). Com relação a sobrevida, 16 cadelas (36%) tiveram sobrevida de seis meses, 12 (27%) 12 meses, seis (13,63%) 18 meses e dez (22%) 24 meses.

Entre as 16 cadelas que tiveram sobrevida de seis meses, os tumores com maior frequência foram: carcinomas de tumor misto grau I (37,5%; n=6) e carcinoma de tumor misto grau II (12,5%; n=2), e com menor frequência os tumores carcinoma simples tubular grau II, carcinoma simples papilar grau II, carcinoma tubular II, carcinoma complexo, carcinoma sólido, carcinoma túbulo papilar I, fibrossarcoma e adenoma simples (6,25% n=1).

As 12 cadelas com sobrevida de 12 meses apresentaram como tipo histológico mais frequente os carcinomas em tumor misto I (33%, n=4), carcinoma simples tubular II (25%, n=3) e os tumores carcinomas em tumor misto II, carcinoma simples papilar II, carcinoma tubular, carcinoma complexo e carcinoma sólido com 8,33% (n=1).

As seis cadelas com sobrevida de 18 meses apresentaram com maior frequência os tumores: carcinoma em tumor misto I (49%; n=3), carcinoma em tumor misto II, carcinoma simples tubulopapilar e carcinoma sólido tiveram frequência de 17% (n=1) entre cada um.

As dez cadelas com sobrevida de 24 meses apresentaram como tipo histológico mais frequente os tumores carcinoma simples tubular II (30%, n=3), carcinoma em tumor misto I (20%, n=2), carcinoma em tumor misto II (10%, n=1), carcinoma simples papilar I (10%, n=1), carcinoma simples papilar II (10%, n=1), carcinoma tubular II (10%, n=1), carcinoma complexo (10%, n=1) e adenoma complexo (10%, n=1).

Quanto ao tempo de evolução (vida) em cães que vieram á óbito (n=20), 27,27% (n=12) obtiveram seis meses de sobrevida após o tratamento cirúrgico; 13,63% (n=6) tiveram 12 meses e 4,54% (n=2) tiveram 18 meses de sobrevida.

Entre as 12 cadelas que tiveram a menor sobrevida (6 meses), os tumores que prevaleceram foram com 58% (n= 6) os carcinomas, sendo o carcinoma em tumor misto I com maior frequência (n=4), e constatou-se o pulmão como local mais comum de metástase (n= 10). O tumor fibrossarcoma foi o segundo tipo mais comum entre as cadelas com menor sobrevida.

Estrela-lima et al. (2010) demonstraram que em carcinomas maiores de cinco centímetros havia correlação com presença de metástases para linfonodo e pulmão.

Seis cadelas tiveram sobrevida 12 meses, e o carcinoma simples tubular II (50%) foi o tumor mais encontrado, sendo o pulmão (75%) também o local mais comum de metástase.

Considerando cadelas que vieram á óbito e as que estavam vivas até o término do experimento, observou-se que cadelas com os tumores carcinoma simples túbulo papilar e o carcinoma simples tubular tiveram maior sobrevida. E as cadelas com os tumores benignos adenoma complexo também tiveram maior sobrevida. E as cadelas com menor sobrevida apresentaram carcinoma sólido, adenocarcinoma, carcinoma tubular papilar e o fibrossarcoma.

Considerando todas as cadelas do experimento, a média de sobrevida foi de 12 meses, sendo que a sobrevida mínima foi de seis meses e a máxima de 24 meses. Queiroga e Lopes (2002) encontraram 17 meses de média de vida de cadelas com tumores mamários malignos e benignos, valor semelhante aos dados do presente estudo. Porém, estatisticamente não foi observada correlação entre tipo histológico com a sobrevida das cadelas ($p>0,05$), como também referido por Queiroga e Lopez (2002).

No presente estudo, as cadelas com carcinoma simples apresentaram maior sobrevida (Tabela 11), sendo o tipo tubular o mais comum. Já Queiroga e Lopes (2002) relataram que as cadelas portadoras de tumor misto tiveram maior sobrevida.

Segundo Cassali et al. (2011) o carcinoma simples é frequente em cadelas e possui capacidade infiltrativa de tecidos adjacentes e vascular e Moulton (1990) diz que a média de sobrevida de cadelas portadoras de carcinoma simples é de 10 a 12 meses. Entre os carcinomas simples, o tipo tubular parece ser o menos agressivo (BURINI, 2007). Apesar das características de agressividade foi o tumor mais frequente entre as cadelas com maior sobrevida, e segundo Misdorp (2002), devido à heterogeneidade dos carcinomas, nem sempre a evidência histológica de malignidade, implica em um curso clínico maligno.

Queiroga e Lopes (2002) observaram que os tumores carcinoma ductal e papilar foram os tumores com maior frequência entre as cadelas que morreram.

Cadelas com o fibrossarcoma apresentaram menor sobrevida. Os fibrossarcomas mamários são os tumores mais comuns entre os sarcomas.

Tem capacidade metastática por via hematológica, porém no curso final da doença (MOULTON, 1990).

No estudo de Karayannopoulou (2005) que também foi realizado no período de dois anos, observou-se que 45,9% das cadelas vieram à óbito, sendo semelhante ao presente estudo, porém, o tipo histológico mais frequente entre essas cadelas com menor sobrevida foi o carcinoma simples, sendo que nosso estudo difere, pois o carcinoma simples foi o tumor de cadelas com maior sobrevida. No estudo de Ribeiro (2012) a média de sobrevida foi de 10 meses, semelhante aos dados do presente estudo, e relata que as cadelas com maior sobrevida foram às acometidas por carcinoma em tumor misto.

Tabela 11. Tipo histológico e média de sobrevida de cadelas com tumores mamários espontâneos, Uberlândia - MG.

Tipo histológico	N	%	Sobrevida (média)	total	óbito	Vivas
Carcinoma em T.M I	14	31,5	12 meses		06	08
Carcinoma em T.M II	05	11	13 meses		02	03
Carcinoma simples túbulo papilar	01	2,2	18 meses		01	0
Carcinoma simples tubular II	10	22	17,4 meses		04	06
Carcinoma tubular II	03	6,8	14 meses		01	02
Carcinoma complexo I	03	6,8	14 meses		01	02
Carcinoma solido II	02	4,5	9 meses		02	0
Carcinoma túbulo papilar I	01	2,2	6 meses		01	0
Carcinoma simples papilar II	01	2,2	6 meses		01	0
Tumor misto benigno	01	2,2	18 meses		0	01
Adenoma complexo	01	2,2	18 meses		0	01
Adenoma simples	01	2,2	18 meses		01	0
Fibrossarcoma mamário	01	2,2	6 meses		01	0

*T.M: tumor misto./ Não houve diferença significativa entre os tipo histológicos ($p>0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis

Entre as 16 cadelas que tiveram sobrevida de seis meses, sete (43,75%) apresentavam ulceração cutânea e 56,25% (n=9) não possuíam ulceração. E em relação ao tamanho dos tumores 6,25% (n=1) eram menores de três centímetros; 18,75% eram tumores entre três e cinco centímetros e 75% eram tumores mamários maiores de cinco centímetros.

Verifica-se que as cadelas que sobreviveram por apenas seis meses apresentavam tumores malignos e a maioria (75%) apresentava tumores maiores de cinco centímetros.

As 12 cadelas com sobrevida de 12 meses, a ulceração foi observada em apenas um caso (8,33%) e 11 cadelas (91,66%) não apresentavam ulceração cutânea. Na avaliação dos tamanhos dos tumores, três (25%) eram menores de três centímetros; também três (25%) eram tumores entre três e cinco centímetros e seis (50%) eram tumores mamários maiores de cinco centímetros.

De maneira semelhante às cadelas com sobrevida de seis meses, todas as cadelas que sobreviveram por 12 meses apresentavam tumores malignos e a maioria (50%) apresentava tumores maiores de cinco centímetros.

As seis cadelas com sobrevida de 18 meses, tumores não ulcerados foram observados em 66,66% das cadelas e 33,33 eram ulcerados. Já com relação ao tamanho tumoral, um (16,66%) era menor de três centímetros; três (50%) eram tumores entre três e cinco centímetros e dois (33,33%) eram tumores mamários maiores de cinco centímetros.

De maneira semelhante às cadelas com sobrevida de seis meses e 12 meses, todas as cadelas que sobreviveram por 18 meses apresentavam tumores malignos. Entretanto, diferentemente das cadelas com sobrevida de seis meses e 12 meses, a maioria (50%) apresentava tumores entre três e cinco centímetros.

As dez cadelas com sobrevida de 24 meses a ulceração cutânea foi observada em apenas uma cadela (10%). E a maioria dos tumores (50%, n=5) era de tamanho menor de três centímetros, 20% (n=2) eram tumores entre três e cinco centímetros e 30% (n=3) eram tumores mamários maiores de cinco centímetros.

De maneira semelhante às cadelas com sobrevida de seis meses, 12 meses e 18 meses, todas as cadelas que sobreviveram por 24 meses apresentavam tumores malignos, com exceção de uma que apresentou adenoma complexo. Entretanto, diferentemente das cadelas com sobrevida de seis meses, 12 meses e 18 meses, a maioria (50%) apresentava tumores menores que três centímetros.

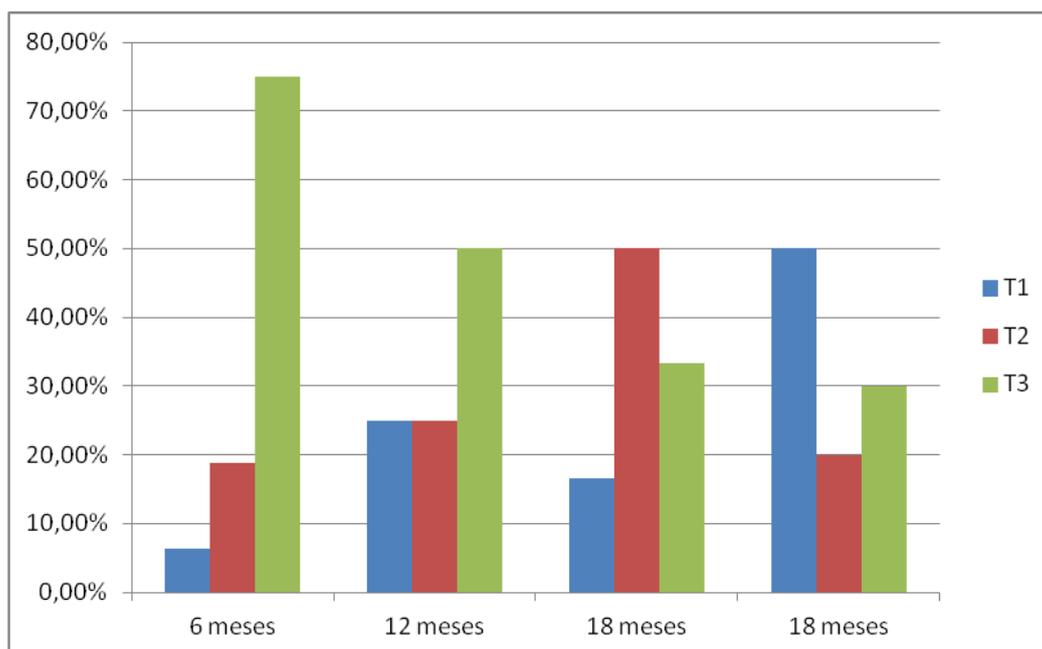
Na correlação da sobrevida com o tamanho do tumor, observou-se diferença estatística, sendo que cadelas com tumores maiores que cinco centímetros tiveram menor sobrevida quando comparadas com cadelas que

possuíam tumores menores ($p < 0,05$) (Tabela 12 e Figura 18). Ao considerar apenas os tumores malignos também houve significância ($p < 0,05$).

Tabela 12. Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com as variáveis tamanho tumoral, presença de ulceração cutânea e uso de hormônios como contraceptivo.

Sobrevida	Tamanho (média)	Ulceração		Hormônio injetável	
		Sim	Não	Sim	Não
6 meses	10,2cm	7	9	6	7
12 meses	6 cm	1	11	3	9
18 meses	5 cm	2	4	1	5
24 meses	4 cm	1	9	2	8

Figura 18. Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com a variável tamanho tumoral.



Segundo Burini (2007) o tamanho dos tumores está correlacionado com a sobrevida das cadelas e com a incidência de recidivas. Pacientes com tumores maiores de cinco centímetros apresentam prognóstico desfavoráveis.

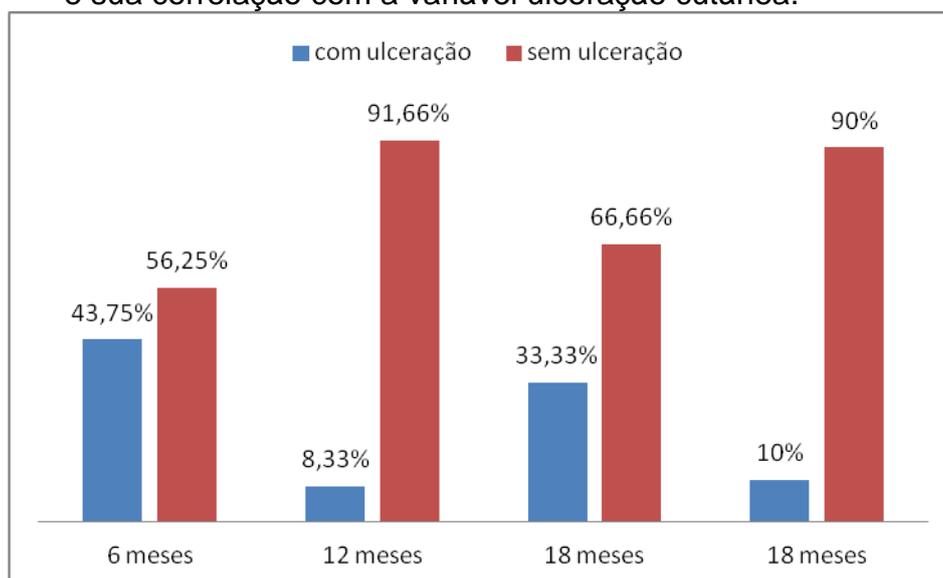
Queiroga e Lopez (2002), Queiroga (2005) e Oliveira (2009) avaliando tamanho dos tumores e sobrevida das cadelas verificaram significância estatística entre estas duas variáveis, ou seja, cadelas com tumores maiores

apresentavam menor sobrevida. Já Estrela-Lima et al. (2012) não encontraram associação entre o tamanho e a sobrevida.

Ao avaliar a presença de ulceração cutânea em tumores mamários juntamente com o uso de hormônio como contraceptivo, não houve estatisticamente associação entre estas variáveis e sobrevida das cadelas ($p>0,05$). Do mesmo modo, ao avaliar cada variável isoladamente também não observou-se correlação entre presença de ulceração cutânea o uso de hormônio como contraceptivo e sobrevida das cadelas ($p>0,05$).

Porém, verificou-se que entre as cadelas que sobreviveram por mais de 24 meses, somente uma apresentava ulceração cutânea. Por outro lado, entre as 16 cadelas que sobreviveram somente seis meses, sete apresentavam ulceração (Figura 19). Hellmen et al. (1993) observaram que ulcerações têm efeito negativo significativo no tempo de sobrevida das cadelas com diagnóstico de tumores malignos.

Figura19. Tempo de sobrevida de cadelas com neoplasia mamária espontânea e sua correlação com a variável ulceração cutânea.



Queiroga e Lopez (2002), Queiroga (2005) e Oliveira (2009) observaram correlação significativa entre a presença de ulceração cutânea dos tumores e a sobrevida, sendo que a ulceração está relacionado a menor sobrevida. Burini (2007) verificou ainda correlação entre presença de ulceração com comprometimento linfonodal, ou seja, as cadelas com ulceração apresentavam metástase para os linfonodos regionais. Hellmen et al. (1993) relacionaram a

presença de ulceração cutânea com os níveis de PRL, GH e IGF-I, e verificaram que estes hormônios estão associados à malignidade tumoral, e portanto a um prognóstico desfavorável.

Apesar de não ter se verificado correlação estatística entre o uso de contraceptivo e a sobrevivência, pode-se observar que a maioria dos animais que sobreviveram mais de 24 meses não utilizou hormônios como método contraceptivo.

Nos tumores mamários, os fatores de prognóstico tradicionais (tamanho do tumor, ulceração, entre outros) apresentam limitações (CARVALHO, 2009). Mas esses achados destacam a importância de monitorar essas características clínico-patológicas, a fim de compreender o câncer mamário (ESTRELA-LIMA et al., 2012) e novos fatores devem ser estudados, a procura de parâmetros eficientes para estabelecer valores prognósticos de cadelas com tumores mamários.

Burini (2007) relatou o predomínio de ulceração nos carcinomas complexos (42%) e que este tipo de tumor pode evoluir para grandes dimensões e vêm a ulcerar, mas apresenta baixo potencial de malignidade. No presente estudo, apesar da média de tamanho do carcinoma complexo ser maior que cinco centímetros e estar classificado na categoria T₃, como citado por Burini (2007), nenhum caso apresentou ulceração cutânea.

Oliveira Filho (2010) encontrou a maioria dos casos de tumores malignos entre as cadelas que utilizavam hormônios como método contraceptivo. Já Oliveira et al. (2003) observaram que a maioria das cadelas que utilizavam hormônios como método contraceptivo desenvolviam tumores benignos. No presente estudo, com exceção do adenoma simples, a maioria das cadelas com tumores benignos não apresentaram histórico de uso de hormônios como método contraceptivo.

Tipo histológico X idade

O carcinoma simples papilar II foi o tipo de tumor que apresentou animais com maior média de idade (16 anos), seguido de carcinoma sólido II (14 anos) e carcinoma simples papilar I, Carcinoma papilar II e Carcinoma túbulo papilar I (13 anos). Já o tipo de tumor que apresentou a menor média de idade foi Carcinoma simples tubular II (8 anos) (Tabela 13).

Tabela 13. Correlação com os vários tipos histológicos e a média de idade de cadelas com tumores mamários

Tipo Histológico	Idade (média)
Carcinoma em tumor misto I	10 anos
Carcinoma em tumor misto II	9,7 anos
Carcinoma simples	11 anos
Carcinoma simples papilar I	13 anos
Carcinoma simples papilar II	16 anos
Carcinoma simples tubular II	8 anos
Carcinoma simples tubular III	10 anos
Carcinoma tubular II	12 anos
Carcinoma papilar I	10 anos
Carcinoma papilar II	13 anos
Carcinoma in situ I	9,6 anos
Carcinoma complexo I	9,8 anos
Carcinoma sólido II	14 anos
Carcinoma túbulo papilar I	13 anos
Fibrossarcoma	12 anos

Não observou-se diferença significativa entre os tipos histológicos dos tumores com relação à idade ($p > 0,05$).

Burini (2007) também não observou significância estatística quando comparou a idade como o tipo histológico como no presente estudo.

Nas mulheres a menor idade é, com frequência, associada ao mau prognóstico, embora esta conclusão não seja uniformemente aceita (Jmor et al., 2002).

Clangan et al. (2008) em um estudo em mulheres com tumores de mama correlacionaram a idade e a sobrevida. Não observou significância entre a idade das mulheres com os tipos histológicos, mas observou significância em relação à idade e a sobrevida, sendo que a ocorrência de tumores em mulheres mais jovens era considerado um fator de risco.

Zuccari et al. (2005) observaram associação quando compararam a idade com expressão de P53, sendo que a expressão intensa (acima de 50% das células marcadas) estava presente em cadelas jovens (abaixo de 10 anos de idade) (57,5%), mostrando maior incidência entre cadelas mais jovens, podendo ser um fator de risco.

A idade é considerada um fator de risco para desenvolvimento de tumores de mama de cadelas, e segundo Sorenmo et al. (2010) o risco começa a ser tornar significativa a partir dos oito anos de idade e aumenta com passar dos anos. Cães jovens são propensos a desenvolver tumores benignos, e a

chance de malignidade aumenta com a idade. Tumores mamários são raros em cães com idade inferior a cinco anos, ao menos se sejam tratadas com hormônios (SORENMO et al., 2010). Mostrando o inverso encontrado nas mulheres, o fator de risco nas cadelas está relacionado com o aumento da idade. Provavelmente, apenas o emprego de novos estudos possa predizer com maior certeza o prognóstico, se cadelas mais jovens ou idosas tem relação com fator de risco.

V. Conclusão

- ✓ A incidência de malignidade foi de 90%.
- ✓ As neoplasias malignas foram predominantes, sendo o tipo carcinoma de maior frequência e entre os benignos o tumor misto foi o mais comum.
- ✓ Animais SRD, cocker, pinscher e poodle apresentam com maior frequência tumores malignos; do mesmo modo cadelas acima de oito anos de idade também apresentam tumores malignos.
- ✓ Não há correlação estatística entre tumores malignos com utilização de hormônios, pseudociese, tamanho de tumor e ulceração. Entretanto, animais que utilizam hormônio como método contraceptivo ou apresentam pseudociese tendem a desenvolver tumores malignos.
- ✓ O método de imuno-histoquímica mostrou-se eficiente para caracterização do infiltrado inflamatório.
- ✓ Tumores malignos assim como os benignos não apresentam diferença estatística com relação a frequência de infiltrado inflamatório, quando utiliza-se como marcadores do processo inflamatório CD3, IgG, MAC 385, CD68, TAL IB5. Há necessidade de maiores estudos no sentido de se caracterizar o papel dos infiltrados inflamatórios no desenvolvimento de neoplasias mamárias.
- ✓ Não há influência da presença de ulceração, utilização de hormônios, ou ocorrência de tumores malignos ou benignos sobre a sobrevida de cadelas portadoras de tumores mamários espontâneos. Por outro lado, o tamanho de tumores influencia a sobrevida das cadelas, sendo que as cadelas com tumores de tamanhos maiores possuem menor sobrevida.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 1, p. 10-30, 2008

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

ALTUCCI, L., GRONEMEYER H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends Endocrinol Metab**, New York, v.12, p.460-468, 2001.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Medicina**. v 53, p 641-53, 1996.

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

BRANDTAEG, P.; JONES, D.; FLAVELL, D.; FAGERHOL, M. Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. **J Clin Pathol**, v.41, n 9, p. 963-70, 1988.

BURINI, C. H. P. **Associações do Índice de Proliferação e de Apoptose Celular com características clínicas, epidemiológicas e histopatológica do câncer mamário de cadelas sem raça definida**. 2007. 126f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

CASSALI G.D. **Estudos morfológicos, imunohistoquímicos e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. 2000. 73f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Patologia, Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2000.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULER, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C.; ZUCCARI, D.A.P.C.; TANAKA, N.M.; RIBEIRO, L.R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.S.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.C.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GUARRIDO, E.; FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI, M.L.X.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S.; CAMPOS, C.B. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v 4, n 2, p 153-180, 2011.

CARVALHO, M. I. S. **Estudo Imuno-histoquímico de infiltrado de linfócito T e da proliferação tumoral nos tumores de mama em cadelas: implicações clínicas**. 2009. 62f. Dissertação (mestrado integrado em Medicina Veterinária)-Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Vila Real, 2009.

CHAMMAS, R., SILVA, D.C.P.; WAINSTEN, J.A.A.; ABDALLAH, K, L. **Imunologia Clínica das Neoplasias**, Faculdade de Medicina-USP, São Paulo-SP, 2004.

CLAGNAN, W.S.; ANDRADE, J.M.; CARRACA, H.H.A.; TIEZZI, D.G.; REIS, F.J.C.; MARANA, H.R.C.; ABRÃO, R.A. Idade como fator independente da prognóstico no câncer de mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. v 30, n 2, p 67-74, 2008.

DALECK, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A.E.; MARTINS, I.M.I. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência rural**, v 28, n 1, p. 95-100, 1998.

DALTOÉ, R. D.; PAULA, A.D.; DASÍLIO, K.L.A.; MADEIRA, K.P.; SILVA, I.V.; RANGEL, L.B.A. O papel paradoxal do sistema imune no câncer de ovário. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 39, n 2, 2010.

DENARDO, D. G.; CONSENS, 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.10, 2007.

DEL CASTILLO, N. M. **Estúdio imunocitoquímico de la expression de la proteína Del gen supresor tumoral p53 y del infiltrado inflamatório en las neoplasias mamarias caninas. Características clinicas e histopatológicas**. 2002. Facultad de Veterinária. (Departamento de Patologia Animal II). Universidad Complutense de Madrid. Madrid. España, 2002.

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

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.T.; 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**, v. 10, p. 256, 2010.

FERREIRA, E. et al. Protocolo para exame anatomopatológico de tumores mamários em cães. In: XXIV Congresso Brasileiro da Anclivepa. **Anais...**, Belo Horizonte, 2003.

FILGUEIRA, K. D. **Características Anatopatológicas de Neoplasias Mamárias em cadelas criadas no município de Fortaleza- CE**. 2003. 80f. Dissertação (mestrado em ciência veterinária) - Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2003.

FIGUEIROA, F.C. **Imunoexpressão de receptores de estrógeno e progesterona, HER-2, P63, CK5, Catepsina, e proteínas S100A4 em carcinomas espontâneos de mama em cadela.** 2009. 55f. Dissertação (Mestrado em patologia) - Faculdade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

GEORGIANNOS, S.; RENAUT, A.; GOODE, A. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cellmediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. **Surgery.** v. 134, p. 827-34, 2003

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

HEIMANN R.; FERQUSON, D.; RECANT, W.M.; HELLMAN, S. Breast cancer metastatic phenotype as predicted by histologic tumor markers. **Cancer Journal Scientific American,** v. 3, n.4, p. 224-229, 1997.

HUSSEIN, M. R.; HASSAN, H. I. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. **Journal Clinical of Pathologyc.** v. 59. p. 972–977, 2006.

HUSSEIN, M. R. AL-ASSIRIBI, M.; MUSALAM, A.O. Phenotypic characterization of the infiltrating immune cells in normal prostate, benign nodular prostatic hyperplasia and prostatic adenocarcinoma. **Experimental and Molecular Pathologyc.** v. 86, p.108-113, 2009.

JMOR, S.; AL-SAYER, H.; HEYS, S.D.; PAYNE, S. MILLER, I. AH-SEE, A.; et al. Breast Cancer in women aged 35 and under: prognosis and survival. **J. R. Coll Surg Edinb.** v 47, n 5, p 693-699, 2002.

JONES, T. C., HUNT, R. D., KING, N. W. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. **Patologia veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000, p. 87-118.

KARAYANNOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C.; DESSIRIS, A. 2005. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**. v 133, p. 246-252, 2005.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. IN___ STEPHEN J. WITHOROW, S.J.; VAIL, D.M. **SMALL ANIMAL CLINICAL ONCOLOGY**. cap 26 , 4 ed, cidade: Sauders, p 619-628, 2007.

LEEK, R.; HARRIS, A. Tumor-associated macrophages in breast cancer. **J Mammary gland biology and neoplasia**. v. 7 n 2, p. 177-89, 2002.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. **Physiol Reviews**. v. 83, p.337-76, 2003.

MARSIGLIANTE, S.; BISCOZZO, L.; MARRA, A.; NICOLARDI, G.; LEO, G.; LOBREGGIO, G B.; STORELLI, C. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. **Cancer Letters**. v. **139**, p.33-41, 1999.

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

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

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals. **Ames: Iowa State**, 4 ed, cap. 12, p.575-606, 2002.

MORRIS, J. S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E.; O'FARREL, E. Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record**. v 142; p 656-658, 1998.

MORRIS, J., MCLNNES, E., BOSTOCK, D., HOATHER, T. ,DOBSON, J. Immunohistochemical and histopathologic features of 14 malignant fibrous histiocytomas from Flat-Coated Retrievers. **Vet Pathol**. v. 39, n 4, p. 473-79, 2002.

MORRISON, W. B. Canine and feline mammary tumours. **Cancer in dogs and cats – medical and surgical management**. Ed. Lippincott. Philadelphia: Williams & Williams,. p 591-598, 1998.

MOULTON, J. E.; ROSENBLATT.; GOLDMAN, M. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. **Veterinary Pathology**. v. 23, p.741–749, 1986.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: _____. **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Los Angeles: University of California Press. cap.12, 1990, p.518-52.

OLIVEIRA FILHO, J. C. **Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães**. 2010. 69f. Dissertação (mestrado em medicina veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMIER, D. Aspectos Epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 31, p. 105-110, 2003

OLIVEIRA, J. M. P. **Aspectos patológicos do mastocitoma cutâneo canino: Relação com características epidemiológicas e clínicas e seu valor**

prognóstico. 2008. 237f. Tese (doutorado em ciências veterinária)- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2008.

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

QUEIROGA, F., LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**. v. 97, n. 543, p. 119-127, 2002.

QUEIROGA, F.L.P.G. **Tumores mamários da cadela – estudo de fatores biológicos (ciclooxigenases 1 e 2; prolactina, hormônio do crescimento; fator 1 de crescimento tipo insulina) e da sua implicação clínica e prognóstica.** 2005. 170f. Tese (doutorado em ciências veterinária)- Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2005.

RIBEIRO, L. G. R. **Carcinoma Inflamatório de mama em cadela: Caracterização da resposta inflamatória, achados clínicos, e anatohistopatológico.** 2012. 142f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária)- Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

RICHARDS, H. G. An epidemiological analysis of a canine-biopsies database compiled by a diagnostic histopathology service. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 51, p. 125– 136, 2001.

RUTTEMAN, G. R. Tumors of the mammary gland. In: ____ WITHROW, S. J. MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. Editora Saunders, 3 ed. Philadelphia, p. 455–477, 2001 .

SILVEIRA, A. C. T. **Caracterização do Infiltrado Inflamatório e Avaliação dos Marcadores de Prognósticos Ki-67, p53, receptores de estrógeno e progesterona no tumor mamário maligno de cadelas.** 2009. 67f. Tese

(doutorado em patologia veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do campus de Jaboticabal-UNESP, 2009.

SILVIA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese tumoral e neoplasias hormônio dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

SHI, S.R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffinembedded tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating Tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 36, n. 6, p. 741-748, 1991.

SORENMO, K.U., RASOTTO, R.; ZAPPULI, V.; GOLDSCHMINDT, M.H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**. v. 48, n. 1, p. 85-97, 2010.

TAVARES W.F., CARNEIRO R.A., CALDEIRA M.I.F., PEREIRA L.C., CASSALI G. D., FERREIRA E., LAVALLE G. Carcinoma Metaplásico da Glândula Mamária em um Macho da Espécie Canina. **Prática Hospitalar**, v.8, n. 44, p. 97-97, 2006.

TERZIAN, A.C.B.; ZUCCARI, D.A.P.C.; PEREIRA, R.S.; PAVAM, M.V.; RUIZ. C.M.; SUEIRO, F.A.R.; COELHO, J. Avaliação de caspase e Ki 67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. v. 44. n. 2, p. 96-102, 2007.

TIZARD, I. **Veterinary Immunology** - An Introduction. Philadelphia, WB Saunders Company. p. 47-68, 2000.

TOLOSA, E.M.C., RODRIGUES, C.J., BEHMER, O.A., FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. Barueri, Editora Manole, P. 331, 2003.

VAKKILA, J.; LOTZE, M. T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat Rev Immunol**. v.4, p. 641-648, 2004.

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

ZUCCARI D.A.P.C. **Contribuição ao estudo imunoistoquímico dos tumores mamários em cadelas**.1999. 121f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 1999.

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 cadelas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 1, p 38-41, 2001.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.6, 2002.

ZUCCARI, D. A. P. C.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; PAVAM, M.V.RUIZ, C.M.; SUEIRO, F.A.R.; ANDRADE, J.C.A.; CORDEIRO, J.A. Avaliação imuno-histoquímica do gene P53 nas neoplásicas mamárias caninas. **ARS Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 344-350, 2005.

ZUCARRI, D. A. P. C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivos de Ciência da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 189-98, 2008.

ANEXOS

Quadro. Características das amostras em estudo e respectivas frequências absolutas e relativas.

Variáveis	N	%
Idade		
≤ 1 ano	0	0
2 – 8 anos	19	23,75
≥ 9 anos	61	76,25
Raça		
SRD	45	56,25
coocker	08	10
pinscher	08	10
poodle	06	7,5
Fila brasileiro	03	3,75
dashchund	03	3,75
boxer	02	2,5
york shire	01	1,25
terrier	01	1,25
husk siberiano	01	1,25
Labrador	01	1,25
pastor alemão	01	1,25
Tamanho		
≤ 3 cm	10	12,5
3-5 cm	40	50
≥ 5 cm	30	37,5
Ulceração		
Presente	20	25
Ausente	60	75
Uso contraceptivo de hormônios		
Sim	19	23,75
Não	61	76,25
Pseudociese		
Com histórico	24	30
Sem histórico	57	71,25

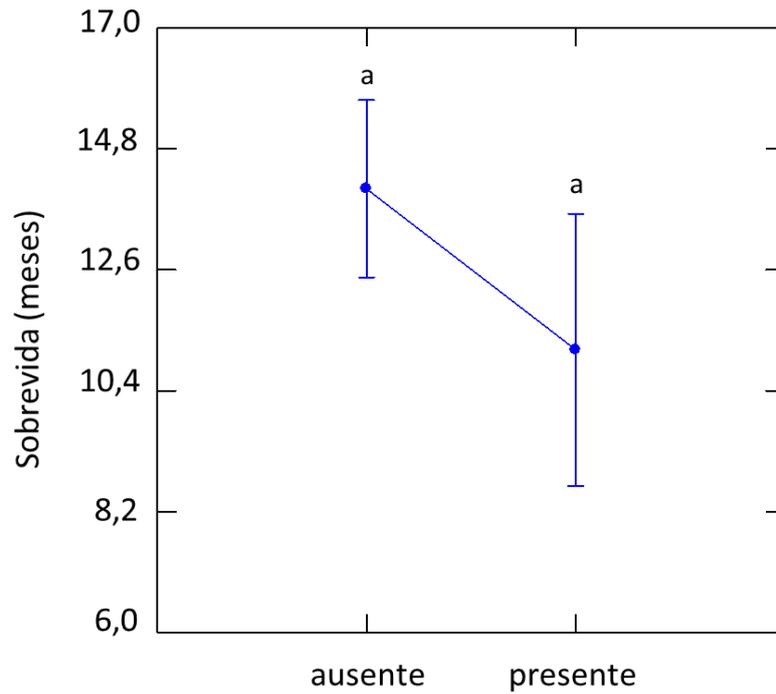


Figura C. Variação da sobrevida (média dos mínimos quadrados) em relação a presença de ulceração cutânea em tumores de cadelas.

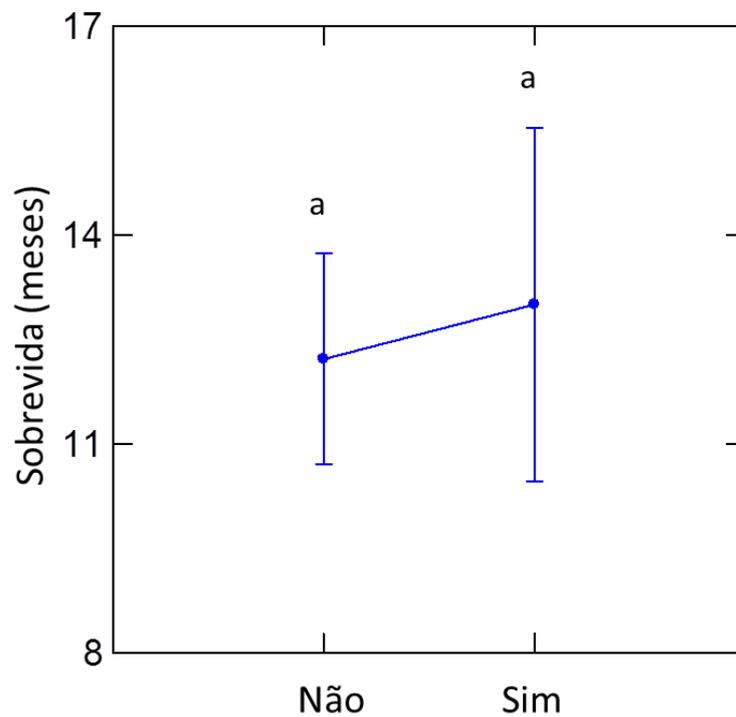


Figura D. Variação da sobrevida (média dos mínimos quadrados) em relação ao uso de hormônios como método contraceptivo em cadelas com tumores mamários

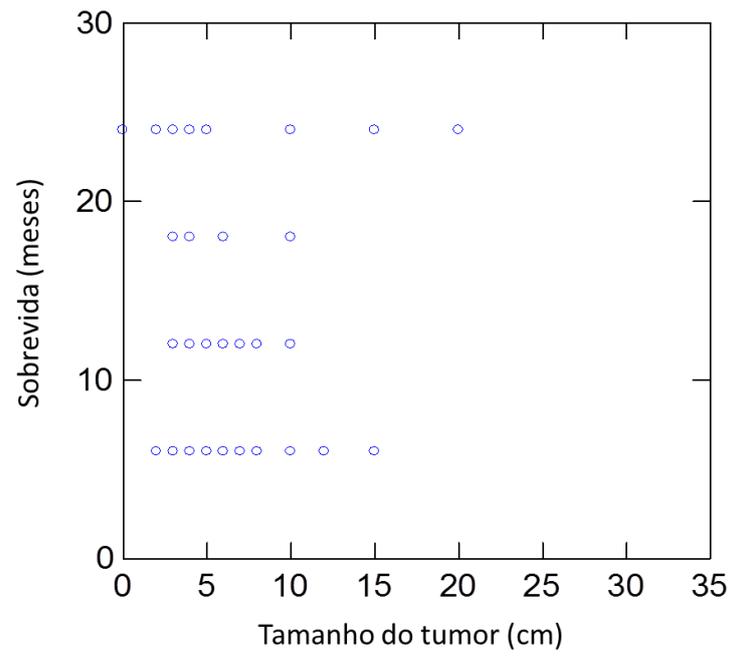


Figura B. Variação da sobrevida em relação ao tamanho dos tumores desenvolvido por cadelas.