

# CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS DE CADELAS

DAMASCENO, K.A<sup>1</sup>; RIBEIRO, L.G.R<sup>1</sup>; COSTA NETO, J.M<sup>2</sup>; TORÍBIO, J.M.M.L<sup>3</sup>; SILVA, N.S\*<sup>1</sup>; AGUIAR, P.H.P<sup>2</sup>; CASSALI, G.D<sup>4</sup>; ESTRELA-LIMA, A.<sup>2</sup>

## Resumo

Em cães, assim como nos seres humanos, o envolvimento do sistema imunológico tem um papel crucial no desenvolvimento de neoplasias, todavia, a participação da resposta inflamatória na promoção e desenvolvimento do câncer ainda é motivo de muita controvérsia. Tendo em vista a necessidade de entender o mecanismo de interação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento tumoral, este trabalho objetivou caracterizar a resposta inflamatória nos carcinomas de mama em 30 cadelas e quantificar os tipos celulares envolvidos, além de correlacionar estes resultados a fatores prognósticos e a taxa de sobrevivência destes animais. Dentre os tipos celulares estudados foi observada uma predominância significativa dos linfócitos, seguidos pela população de macrófagos, plasmócitos, e menos freqüentemente de neutrófilos. Os linfócitos apresentaram correlação significativa com a graduação ( $p=0,001$ ), tipo histológico ( $p=0,018$ ) e metástase ( $p=0,023$ ). Linfonodos acometidos revelaram correlação com macrófagos ( $p=0,037$ ) e linfócitos ( $p=0,032$ ). Não houve diferença estatística entre os tipos celulares analisados em relação ao tempo de sobrevivência global. Todavia, se observou que animais com resposta inflamatória exuberante, com predomínio de linfócitos, associada ao tumor apresentaram menor taxa de sobrevivência. Diante das importantes correlações observadas entre linfócitos/macrófagos e alguns fatores prognósticos, bem como a maior intensidade do processo inflamatório nos carcinomas mais agressivos é vigente a necessidade de mais estudos para entendimento da dinâmica interação entre a inflamação e o desenvolvimento tumoral.

Palavras-chave: Cadela; carcinoma- mamário; inflamação.

## Introdução

Nas últimas décadas, cresce consideravelmente o interesse dos pesquisadores pelos tumores mamários da cadela. Fato este que se explica devido à semelhança em diversos aspectos com os tumores de mama da mulher e também pela alta freqüência desta patologia na rotina clínica dos animais de companhia (SILVA et al., 2004). Em cães, assim como nos seres humanos, o envolvimento do sistema imunológico tem um papel crucial no desenvolvimento de neoplasias, todavia, a participação da resposta inflamatória na promoção e desenvolvimento do câncer ainda é motivo de controvérsia, pois envolve mecanismos extremamente complexos e ainda pouco elucidados. Pesquisadores estimam que a inflamação contribua para o desenvolvimento no mínimo de 15% de todos os cânceres (GIERCKSKY, 2001).

O processo inflamatório associado ao desenvolvimento neoplásico envolve uma complexa resposta do hospedeiro. Esta inclui o recrutamento de células do

1. Graduanda de Medicina Veterinária ESCMEV/ UFBA e Bolsista PIBIC.

2. Professor Departamento de Patologia e Clínicas, ESCMEV-UFBA. [aestrela@ufba.br](mailto:aestrela@ufba.br)

3. Aluno de pós-graduação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA)

4. Professor Departamento de Patologia Geral/ Laboratório de Patologia Comparada, ICB-UFMG.

sistema imune (linfócitos e macrófagos/células dendríticas), células acessórias desse sistema (eosinófilos, basófilos e mastócitos), mediadores inflamatórios e a interação entre citocinas e receptores. Acredita-se que as células responsáveis pela modulação da resposta inflamatória, em determinadas situações, liberem fatores autócrinos e parácrinos que estimulam a proliferação celular, inibem a apoptose, induzem a angiogênese e interfere com a resposta do sistema imune a agressão. Esses fatores em conjunto podem acelerar a mutagênese, promover a sobrevivência de clones atípicos o que por sua vez, aumenta a probabilidade destes clones adquirirem capacidade de invasão de tecido e órgãos (THUN et al., 2004).

Na resposta inflamatória associada ao câncer de mama, ocorre um significativo incremento de macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Estudos têm relatado que a maioria dos carcinomas mamários, em mulheres, é infiltrada por linfócitos, predominantemente linfócitos T. Estes, localizados na periferia do tumor de mama, são capazes de converter a androstenediona em estrona, a partir da produção de enzimas envolvidas na síntese do estrogênio ou de citocinas que afetam a atividade destas enzimas, contribuindo para a proliferação neoplásica. Todavia, para Blankenstein (2004), a presença de infiltrados linfocitários no tumor de mama indica um melhor prognóstico, pois esse tipo de resposta pode ser o ponto crítico para a rejeição tumoral. Os macrófagos ativados, por sua vez, produzem citocinas, TNF- $\alpha$ , ILs, IFNs e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (ASPORD et al., 2007). O NF- $\kappa$ B tem sido associado à promoção de mudanças celulares, que culminam com a proliferação das células tumorais e a intermediação na liberação de células metastáticas a partir do tumor original (MARX, 2004). Aparentemente, o tipo, a intensidade e o momento do início da resposta inflamatória induzida pela ação de citocinas, são fatores que definem se o processo inflamatório atuará como promotor ou inibidor do desenvolvimento tumoral (BLANKENSTEIN, 2004).

Neste contexto, tendo em vista a necessidade de entendimento da dinâmica interação entre a inflamação e o desenvolvimento tumoral, este trabalho teve por objetivo caracterizar a resposta inflamatória associada aos carcinomas mamários de cadela e quantificar os tipos celulares envolvidos, bem como correlacionar tal resposta a fatores prognósticos e a taxa de sobrevivida global dos animais.

### Materiais e Métodos

Trinta fêmeas caninas com diagnóstico de neoplasia mamária atendidas no Hospital Veterinário da UFBA (Salvador-Bahia) foram acompanhadas, no período de agosto/2007 a Junho/2008. Os animais foram submetidos ao exame clínico e realização do estadiamento (TNM), e em seguida encaminhados para realização de raio-x simples de tórax para pesquisa de metástase pulmonar. O tipo de cirurgia foi determinado pelo tamanho do tumor, sua localização e drenagem linfática. Os animais que fizeram uso recente de drogas anti-neoplásicas, antiinflamatórios e antibióticos foram excluídos da pesquisa.

Imediatamente após a cirurgia, foram coletados fragmentos da(s) mama(s) afetada(s) que incluíram pele e tecido subcutâneo além dos linfonodos regionais. Quando houve presença de mais de um tumor no mesmo animal, no momento da exérese cirúrgica, a coleta dos fragmentos foi realizada separadamente. Os fragmentos coletados foram fixados em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 $\mu$ m foram coradas pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina, para

posterior classificação histopatológica, tendo como base às normas da Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores e displasias da glândula mamária de cães e gatos (MISDORP et al., 1999). Foi realizado o acompanhamento trimestral dos animais para determinação da taxa de sobrevivência livre da doença até um ano após a cirurgia. Apenas três dos seis proprietários de animais que vieram a óbito durante a realização desta pesquisa autorizaram a realização da necropsia dos respectivos cadáveres. A partir do exame anátomo-histopatológico foi possível determinar a *causa mortis* e confirmar a existência ou não de metástases. O projeto de pesquisa se desenvolveu dentro das normas exigidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

A resposta inflamatória foi analisada quanto a sua intensidade e distribuição em discreta, moderada e intensa, focal, multifocal e difusa, respectivamente. Foram analisados cinco campos de cada lâmina/tumor e para a escolha destes campos foi considerado os campos mais representativos da resposta inflamatória "hotspots". Após a identificação e marcação destas áreas, foi realizada a captura das imagens (câmera digital adaptada a um Microscópio Olympus BX-40) e utilizado o software de captura SPOT<sup>®</sup> versão 3.4.5. A fenotipagem e quantificação dos tipos celulares foram realizadas com base na análise destas imagens (software Corel Draw versão 7.468).

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SPSS 13.0. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Kewls (SNK) e correlação de Pearson. Para avaliação do tempo de sobrevivência livre da doença foi utilizada a análise da Kaplan Meyer. Pelo teste log-rank os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . O tempo de sobrevivência livre da doença foi definido (em dias) como sendo o período entre o exérese cirúrgica do tumor primário e a recorrência local/metástase à distância ou data de óbito do animal que morreu pela doença. Os animais cujo contato foi perdido foram considerados censurados.

## Resultados e Discussão

Na maioria dos casos, observou-se maior acometimento em cadelas da raça poodle (12/40%), seguida pelos animais racialmente indefinidos (8/26,7%), concordando com os achados de Meuten (2002). Todavia, a frequência elevada do diagnóstico de neoplasias mamárias nos Poodles, neste estudo, não é suficiente para confirmar maior predisposição desta raça, tendo em vista o tamanho amostral.

A idade das cadelas estudadas variou entre seis e 14 anos, sendo a média de 10,2 anos, corroborando com os dados apresentados na literatura que apontam seis a doze anos como a faixa etária de maior incidência. A maioria das cadelas apresentou acometimento bilateral da cadeia mamária (23/76,6%) com nódulos múltiplos, e número de mamas acometidas superior a cinco (12/40%), localizadas com maior frequência nas mamas abdominal caudal (30/24,6%) e inguinal (41/33,6%). Meuten (2002) afirma que estas mamas são mais acometidas, devido à maior quantidade de parênquima mamário, conseqüentemente, maior possibilidade de resposta proliferativa a ação de hormônios. Frequentemente, mais de uma glândula tem desenvolvimento tumoral, a exemplo do que foi constatado neste trabalho. Nódulos ulcerados foram observados em apenas oito casos (26,7%).

O estadiamento clínico, realizado em todos os animais, revelou maior incidência dos estádios I e II, ambos com frequência de 30%, seguidos do estágio III

(23,3%), estágio V (13,3%), por fim estágio IV (3,4%). Em apenas quatro casos foram diagnosticados metástase pulmonar com base nos exames radiográficos (13,3%). Todas as fêmeas com estadiamento V, ou seja, com presença de metástase à distância, vieram a óbito antes dos 100 dias de acompanhamento, enquanto 80% das cadelas em estágio I e 60% das cadelas que apresentaram apenas alterações circulatórias nos linfonodos regionais sobreviveram ao tempo máximo de acompanhamento (309 dias). Esses resultados refletem a significativa correlação existente entre a taxa de sobrevivida, envolvimento linfático e presença de metástase à distância.

Os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com o diagnóstico histopatológico: carcinoma evoluindo em tumor misto benigno (CATMB) e outros carcinomas (CA), sendo o último grupo representado por cinco carcinomas tubulares, dois papilares e um carcinoma sólido. Uma incidência maior de carcinomas evoluindo em tumor misto benigno (22/73,3%) foi observada em relação aos outros carcinomas (8/26,7%), corroborando com os achados de Cavalcanti (2006). No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos CATMB e CA, a média de sobrevivida livre da doença foi superior no primeiro grupo indicando um melhor prognóstico.

O exame microscópico dos linfonodos revelou que quatro casos (13,3%) corresponderam à hiperplasia reacional; cinco casos (16,7%) a alterações circulatórias; 15 casos (50%) apresentaram hiperplasia associado às alterações inflamatórias; cinco casos (16,7%) metástase de carcinoma mamário, e apenas 1 caso (3,3%) não apresentou nenhuma alteração significativa.

A resposta inflamatória dos carcinomas apresenta distribuição ora focal (40%), ora multifocal (40%), e em menor proporção de forma difusa (20%). Nos carcinomas evoluindo em tumor misto, o processo inflamatório é em sua maioria focal (10/43,5%), enquanto que os outros tipos de carcinomas mostram células inflamatórias distribuídas multifocalmente (4/50%). Nos dois casos de carcinoma inflamatório foi observado intenso infiltrado inflamatório. Dentre os tipos celulares estudados foi observada uma predominância significativa dos linfócitos ( $340,7 \pm 291,857$ ), seguidos pela população de macrófagos ( $228,97 \pm 168,044$ ), plasmócitos ( $165,97 \pm 204,464$ ), e menos freqüente os neutrófilos ( $61,87 \pm 127,747$ ). Os linfócitos apresentaram correlação significativa com tipo histológico ( $p=0,018$ ), linfonodos ( $p=0,032$ ) e metástase ( $p=0,023$ ). A atuação deste tipo celular no desenvolvimento tumoral ainda é motivo de controvérsia. Para Blankenstein et al. (2004) a presença de linfócitos T no sítio tumoral é fator crítico para rejeição da neoplasia. Alguns trabalhos relatam que infiltrados linfocíticos mais intensos estão correlacionados com prognóstico favorável. Todavia, alguns estudos relatam que pacientes com câncer intensamente infiltrados por linfócitos apresentam um pior prognóstico e existem ainda aqueles que não observaram a existência de tal correlação (ASPORD et al., 2007).

Linfonodos acometidos também revelaram correlação com macrófagos ( $p=0,037$ ), contudo, permanece obscura a ação dos macrófagos, se propiciando ou impedindo o desenvolvimento tumoral. Dentre os mecanismos propostos para a ação antitumoral tem-se a ação dos macrófagos ativados produzindo citocinas, TNF-, ILs, IFNs e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Este tem sido associado à promoção de mudanças celulares, que culminam com a proliferação das células tumorais e a intermediação na liberação de células metastáticas a partir do tumor original (MARX, 2004). O estadiamento foi correlacionado positivamente com infiltrado plasmocítico (0,035). Infiltração difusa deste tipo celular é

frequentemente relatada em torno dos carcinomas mamários indiferenciados de caninos (MISDORP et al., 1999).

O tempo máximo de sobrevida de 309 dias foi alcançado por 15 animais, o mínimo, foi zero dia, referente à cadela que veio a óbito logo após a cirurgia, sendo a média de 197,83 dias. O grupo CATMB embora tenha apresentado uma média de sobrevida global ( $202,95 \pm 120,29$ ) superior ao grupo dos CA ( $183,75 \pm 134,87$ ), não foi observada diferença significativa entre os grupos. Os episódios de metástase à distância corresponderam a 13,3% (4) e todos eles vieram a óbito. Recidiva local representou 23,3% (7) e em apenas dois casos, houve perda de contato com os proprietários, sendo estes animais considerados censurados. Os três animais submetidos à necropsia no Setor de Anatomia Patológica do HOSPMEV apresentaram como *causa mortis* insuficiência respiratória aguda em consequência da metástase pulmonar de tumor mamário resultando em hemotórax.

A sobrevida apresentou relação com envolvimento linfático ( $p=0,030$ ), estágio ( $p=0,008$ ) e metástase ( $p=0,003$ ). Não foi observada diferença estatística significativa entre os tipos celulares e quantidade de células inflamatórias totais em relação ao tempo de sobrevida global dos animais. Entretanto, foi observado que 70% dos animais que apresentaram intervalo de linfócitos II (301 a 600 linfócitos) e 80% dos animais que apresentaram intervalo do total de células inflamatórias II (501-1000 células) sobreviveram mais que 309 dias, o que pode indicar os efeitos benéficos de uma resposta inflamatória moderada.

## Conclusão

Diante das importantes correlações observadas entre linfócitos/macrófagos e alguns fatores prognósticos, bem como a maior intensidade do processo inflamatório nos carcinomas mais agressivos é vigente a necessidade de entendimento da dinâmica da interação entre a inflamação e o desenvolvimento tumoral.

## Referências

ASPORD, C.; PEDROZA-GONZALEZ, A.; GALLEGOS, M. et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. **The Rockefeller University Press** . v. 204, n. 5, p. 1037 – 1047, 2007.

BLANKENSTEIN, T. The role of inflammation in tumour growth and tumour suppression. **Novartis Found Symp.** v. 256, p. 205-10, 2004.

CAVALCANTI, M. F. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de nottingham. 2006. 106f. **Dissertação (Mestrado em Patologia)**- Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG.

GIERCKSKY, K.-E.. COX-2 inhibition and prevention of cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 5, pp. 821-833, 2001.

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

MEUTEN, R. G. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa State: Univ. California, 2002, 788p.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC, **Arm. Forc. Inst. Pathol.** American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.

SILVA, A. E., SERAKIDES, R., CASSALI, G. D. Hormonal carcinogenesis and hormone dependent neoplasm. **Cienc. Rural**, Mar./Apr., n.2, v.34, p.625-633, 2004.

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