

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



**Tese**

**Avaliação da Resposta Inflamatória em Carcinomas Mamários de Gatas**

**Michele Berselli**

**Pelotas, 2019**

**Michele Berselli**

**Avaliação da Resposta Inflamatória em Carcinomas Mamários de Gatas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Gevehr Fernandes

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B535a Berselli, Michele

Avaliação da resposta inflamatória em carcinomas mamários de gatas / Michele Berselli ; Cristina Gevehr Fernandes, orientadora. — Pelotas, 2019.

55 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Tumor mamário. 2. Felinos. 3. Microambiente tumoral. 4. Fator prognóstico. 5. Neoplasia. I. Fernandes, Cristina Gevehr, orient. II. Título.

CDD : 636.7089

Michele Berselli

Avaliação da Resposta Inflamatória em Carcinomas Mamários de Gatas

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/12/2019

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Gevehr Fernandes (Orientador)  
Doutora em Patologia pela Universidade Estadual Paulista

Dr. Thomas Normanton Guim  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiane Borelli Grecco  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Teixeira Tillmann  
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

## **Dedicatória**

“Dedico esta pesquisa aos meus pais e minha irmã, meus maiores e melhores orientadores na vida.”

## **Agradecimentos**

O processo de construção desta tese foi uma experiência desafiadora, desde a proposta inicial de trabalhar com neoplasias de mama de gatas (este pet em ascensão no Brasil) até “fugir” do comum buscando entender melhor o microambiente tumoral. Muito esforço e resiliência foram necessários neste novo campo de descobertas, foram grandes os desafios, fracassos e conquistas, mas ao final ficou um grande aprendizado.

Este período foi uma verdadeira jornada de autodescoberta, onde os desafios foram muitos e dos mais diversos, muitas renúncias foram necessárias, e mais que tudo, foi necessário muita força e fé. Portanto, agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço aos meus pais Amabel e Elias, e minha irmã gêmea Cristiane, pelo apoio incondicional, pelo incentivo nesta jornada e principalmente pelos ensinamentos de força e superação. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos. A todos os meus pets, em especial a Nuggia e Noah, pelo qual escolhi esta profissão.

Agradeço a minha professora e orientadora Cristina Gevehr Fernandes, pelo grande exemplo como docente, pela amizade e confiança. Agradeço principalmente por me acolher e pela oportunidade de trabalhar nesta equipe que se tornou a minha segunda família.

Agradeço as colegas de pós-graduação do Sovet, que tornaram os dias mais leves e serenos ao logo destes três anos, mesmo durante a correria do dia a dia para organizar toda a rotina. Vocês são mais que colegas, são amigas de uma vida! Obrigada pelo companheirismo, pelo apoio, conselhos e principalmente pela amizade. Agradeço também aos colaboradores e estagiários do Sovet, pois o convívio com vocês fez tudo isso valer a pena.

A todos os professores, em especial a professora Fabiane Grecco, pela amizade e ensinamentos, ao professor Fabio Bruhn que me fez entrar de cabeça no

mundo da estatística, e a todos os técnicos do Departamento de Patologia, agradeço por todo incentivo, carinho e disponibilidade no auxílio deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas e a Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de me aprimorar desde a graduação e por proporcionar ensino de qualidade.

A realização desta tese marca o término de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a sua concretização.

Muito Obrigada!

## Resumo

BERSELLI, Michele. **Avaliação da Resposta Inflamatória em Carcinomas Mamários de Gatas**. 2019. 55f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Os tumores mamários são o terceiro tipo tumoral mais comum na espécie felina e em sua maioria são carcinomas. Vários parâmetros são considerados importantes indicadores prognósticos para estas neoplasias, para gatas. São considerados bons parâmetros prognósticos o tamanho, grau histológico e invasão linfonodal/linfovascular. Tem sido considerado como potencial fator prognóstico a resposta inflamatória associada ao tumor. As células inflamatórias no microambiente tumoral podem estar envolvidas na promoção ou na supressão do crescimento neoplásico. Estas células podem incluir linfócitos T, macrófagos, células natural killer, linfócitos B e plasmócitos. Ainda não é conhecido o perfil do infiltrado inflamatório associado aos carcinomas mamários de felinos. Portanto, são incluídos nesta tese dois artigos científicos. Realizou-se um levantamento para determinar a prevalência dos neoplasmas mamários felinos, quanto aos seus tipos histológicos e distribuição. Posteriormente foi realizada uma análise do infiltrado inflamatório em neoplasmas mamários de gatas, para determinar a distribuição, os tipos celulares, a média de células inflamatórias e linfocitárias e a intensidade do infiltrado total e linfocitário, comprando-os com parâmetros prognósticos conhecidos. Para a avaliação da distribuição do infiltrado inflamatório, obteve-se os resultados de 66 carcinomas mamários, no qual a distribuição foi predominantemente multifocal em 84,8% dos casos. Houve predomínio de linfócitos na quase totalidade dos neoplasmas ( $n = 791 \pm 659$ ). Foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório e linfocitário de 33 carcinomas mamários, onde a intensidade foi predominantemente de baixa contagem independentemente do tipo histológico, grau e tamanho. Foi realizada uma análise imunoistoquímica dos linfócitos B e plasmócitos utilizando o marcador CD79a. Foram analisados 28 carcinomas mamários onde obteve-se a média de células imunomarcadas e estas foram categorizadas de acordo com as características do infiltrado, como ausente, difuso e em forma de agregados. O infiltrado de células CD79a foi predominantemente difuso, formando poucos agregados nos carcinomas de modo geral. A média geral das células imunomarcadas foi de  $50 \pm 70$  células. Células CD79a positivas apresentaram diferenças significativas para distribuição ( $p = 0,038$ ), no tamanho ( $p = 0,045$ ) e invasão linfática ( $p = 0,039$ ), sugerindo que um maior número de células CD79 pode estar relacionado a um melhor prognóstico.

**Palavras-chave:** Tumor mamário; Felinos; Microambiente tumoral; Fator prognóstico; Neoplasia, Imunoistoquímica.

## Abstract

BERSELLI, Michele. **Evaluation of Inflammatory Response in Feline Mammary Carcinomas**. 2019. 55f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Mammary tumors are the third most common tumor type in feline species and are mostly carcinomas. Several parameters are considered important prognostic indicators for these neoplasms for cats. Good prognostic parameters are considered as size, histological grade and lymph node / lymphovascular invasion. A potential prognostic factor has been the tumor-associated inflammatory response. Inflammatory cells in the tumor microenvironment may be involved in promoting or suppressing neoplastic growth. These cells may include T lymphocytes, macrophages, natural killer cells, B lymphocytes and plasmacytes. The profile of the inflammatory infiltrate associated with feline mammary carcinomas is not yet known. Therefore, two scientific papers are included in this thesis. A survey was carried out to determine the prevalence of feline mammary neoplasms, regarding their histological types and distribution. Subsequently, an analysis of the inflammatory infiltrate in cat mammary neoplasms was performed to determine the distribution, cell types, mean inflammatory and lymphocyte cells and intensity, with known prognostic parameters. To evaluate the distribution of inflammatory infiltrate, we obtained 66 mammary carcinomas, in which the distribution was predominantly multifocal in 84.8% of the cases. Lymphocytes predominated in almost all neoplasms ( $n = 791 \pm 659$ ). The intensity of the inflammatory and lymphocyte infiltrate of 33 mammary carcinomas was evaluated, where the intensity was predominantly low, regardless of histological type, grade and size. An immunohistochemical analysis of B lymphocytes and plasma cells was performed using the CD79a marker. Twenty-eight mammary carcinomas were analyzed for CD79a labeling, where the mean immuno-labeled cells were obtained and categorized according to the infiltrate characteristics as absent, diffuse and in the form of aggregates. CD79a cell infiltrate was predominantly diffuse, forming few aggregates in carcinomas overall. The overall mean of the immunostained cells was  $50 \pm 70$  cells. Positive CD79a cells showed significant differences in distribution ( $p = 0.038$ ), in size ( $p = 0.045$ ) and lymphatic invasion ( $p = 0.039$ ), suggesting that a larger number of CD79 cells may be related to a better prognosis.

**Keywords:** Mammary tumor; Feline; Tumor microenvironment; Prognostic factor; Neoplasia; Immunohistochemistry.

## Lista de Figuras

### Artigo 2

- Figura 1 Tipos histológicos de carcinoma mamário de gatas (Hematoxilina-eosina) 40X. A) Carcinoma tubular composto por proliferação epitelial disposta de forma predominantemente tubular. B) Carcinoma sólido constituído por células epiteliais que formam cordões ou ninhos de células, sem formação de luz tubular. C) Carcinoma cribriforme composto por proliferação de células epiteliais neoplásicas formando um arranjo semelhante a uma peneira..... 36
- Figura 2 Composição do infiltrado inflamatório nos carcinomas mamários felinos..... 37
- Figura 3 Fotomicrografia de imunoistoquímica em carcinoma mamário de gata utilizando anticorpo anti-CD79a. A) Marcação de linfócitos B no infiltrado inflamatório peritumoral. B) Marcação de linfócitos B em áreas de invasão tumoral. Notar células epiteliais neoplasias invasivas (\*) ..... 40

## **Lista de Tabelas**

### **Artigo 1**

Tabela 1	Frequência das alterações neoplásicas e não neoplásicas em 70 gatas.....	27
Tabela 2	Principais tipos e associações de tumores mamários malignos e benignos diagnosticados em gatas.....	28

### **Artigo 2**

Tabela 1	Quantificação das células inflamatórias totais e linfocitárias nos carcinomas mamários de gatas.....	38
Tabela 2	Avaliação da intensidade do infiltrado total e linfocitário dos carcinomas mamários em gatas.....	39
Tabela 3	Características dos carcinomas mamários quanto a densidade de marcação de CD79a .....	40
Tabela 4	Quantificação de células CD79a quanto aos parâmetros histológicos analisados nos neoplasmas mamários malignos em felinos.....	41

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Artigo.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Artigo 1: Caracterização anatomopatológica de tumores mamários de 70 gatas.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Artigo 2: Células inflamatórias infiltrantes: Perfil e distribuição em carcinomas mamários de gatas.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Considerações finais.....</b>	<b>46</b>
<b>Referências.....</b>	<b>47</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>54</b>

## 1 Introdução

Os tumores mamários são o terceiro tipo tumoral mais comum na espécie felina (ZAPPULLI et al., 2005; CASSALI et al., 2018), representam 17% dos tumores em gatas (BORREGO et al., 2009; MISDORP, 2002) e 80-96% dos tumores mamários são malignos, os quais, na maioria são carcinomas (OVERLEY et al., 2005; SEIXAS et al., 2008; MISDORP, 2002).

Tumores mamários em gatas são menos diversos do que em cães e, portanto, menos subtipos são encontrados em gatas (MISDORP, 2002). Além disso, vários nódulos mamários concomitantes ocorrem com frequência (ZAPPULLI et al., 2005).

Sabe-se que os fatores prognósticos dos tumores de mama da mulher, gata e cadela são similares (MISDORP, 2002). Vários parâmetros são considerados importantes indicadores prognósticos para estas neoplasias, tais como idade, tamanho primário do tumor, comprometimento de linfonodos, número de mitoses, extensão da necrose, margens cirúrgicas e tipo de invasão (SARLI et al., 2003; WINSTON et al., 2005; GOLDSCHMIDT, PEÑA & ZAPPULLI, 2017). Para felinos, são considerados bons parâmetros prognósticos o tamanho, grau histológico e invasão linfonodal/linfovascular (ZAPPULLI et al., 2015; SEIXAS et al., 2011; VISTE et al., 2002).

Outro parâmetro histológico relevante que foi considerado como potencial fator prognóstico é a resposta inflamatória associada ao tumor (O'NEILL et al., 2009; CARVALHO et al., 2011). As células inflamatórias no microambiente tumoral podem estar envolvidas na promoção ou na supressão do crescimento neoplásico. A interação entre células tumorais e outras células presentes no microambiente tumoral pode ser decisivo para o crescimento e a metástase, que pode ser potencializada pelo infiltrado inflamatório no microambiente tumoral através do remodelamento de tecidos e liberação de proteases, citocinas e fatores de crescimento (SALGADO et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). Estas células podem incluir linfócitos T auxiliares (Th1 e Th2), linfócitos T reguladores, linfócitos T citotóxicos, macrófagos (M1 e M2), células Natural Killer (NK), linfócitos B, entre outros (ESTRELA-LIMA et al., 2010; RAPOSO et al., 2014; CARVALHO et al., 2016)

O desenvolvimento do câncer de mama humano é caracterizado por um aumento significativo nos linfócitos no estroma neoplásico. Estes desempenham um papel essencial na mediação da resposta à quimioterapia e na melhoria dos resultados clínicos em todos os subtipos de câncer de mama (SALGADO et al. 2015; CARVALHO et al. 2016; STANTON & DISIS, 2016). Em cães, um número maior de linfócitos infiltrativos, principalmente linfócitos T CD4, juntamente com a presença de metástases está relacionado com menores taxas de sobrevivência em cães (MACCHETTI et al. 2006; ESTRELA-LIMA et al. 2010). Por outro lado, um menor número de linfócitos infiltrativos, e com predomínio de células T CD8 apresentam melhor prognóstico para tumores mamários de cadelas, e pode representar um bom marcador prognóstico complementar (ESTRELA-LIMA et al. 2010). Portanto, uma resposta imune dirigida ao tumor envolvendo células T CD8+ citotóxicas, células T helper 1 (Th1) e células NK parece proteger contra o desenvolvimento e progressão tumoral (CARVALHO et al. 2014).

As células B desempenham um papel importante na modulação da resposta imune ao câncer e são o segundo linfócito infiltrante de tumor mais abundante e podem agir tanto na promoção como na supressão do crescimento tumoral em determinados tipos de tumor em humanos (YUEN et al., 2016). A presença de células B infiltradas em tumores de mama humanos tem ação benéfica apresentando uma resposta contra antígenos de tumor (MAHMOUD et al. 2012). Porém, em cães, um número expressivo de células B está associado a um comportamento tumoral agressivo em neoplasmas mamários (KIM et al., 2013).

Além dos linfócitos, os macrófagos também podem desempenhar um importante papel na progressão tumoral. Os macrófagos associados a tumores promovem a inflamação, a degradação e a remodelação da matriz extracelular que facilitam a angiogênese e promovem a mobilidade das células tumorais (CONDEELIS, POLLARD, 2006; RAPOSO et al. 2014). Nos estágios iniciais da tumorigênese, os macrófagos são encontrados nos pontos de ruptura da membrana basal durante a transição para malignidade e na frente invasiva de tumores mais avançados (CONDEELIS, POLLARD, 2006).

Não há dados a cerca do papel das células inflamatórias nos neoplasmas mamários de gatas. Considerando esse contexto, buscou-se estabelecer o perfil morfológico do infiltrado inflamatório nos neoplasmas mamários de gatas, e a

imunomarcção de células B e plasmócitos para determinar se estes podem ser utilizados como marcadores prognósticos em carcinomas mamários de felinos.

## **2. Artigos**

## **2. Artigo**

### **2.1 Artigo 1**

#### **Caracterização anatomopatológica de tumores mamários de 70 gatas**

Michele Berselli, Clarissa Caetano de Castro, Thomas Normanton Guim & Cristina Gevehr Fernandes

Submetido à revista Caderno de Pesquisa

## **Caracterização anatomopatológica de tumores mamários de 70 gatas**

### **Anatomopathological characterization of mammary tumors in 70 cats**

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo descrever as lesões não neoplásicas e neoplásicas de mamas de gatas, quanto a sua distribuição e tipos histológicos. Foram revisados os resultados de exames de biópsias e necropsias de gatas com diagnóstico clínico de tumor mamário, encaminhados para o Serviço de Oncologia Veterinária – UFPEL (SOVET-UFPEL). Os dados foram categorizados quanto à raça, idade e tipos histológicos. Todos os animais com tumores mamários eram fêmeas, predominando as gatas sem raça definida e idosas. Foram totalizados 156 diagnósticos em 70 gatas (8 gatas apresentaram somente lesões não neoplásicas e 62 apresentavam lesões neoplásicas). Destes, 40 eram alterações não neoplásicas, 3 tumores benignos e 113 eram de tumores malignos. Neste estudo as alterações não neoplásicas mais frequentes foram a adenose e a ectasia ductal; todos os benignos eram adenomas e os neoplasmas malignos mais frequentes foram os carcinomas tubulares, sólidos e cribriformes. Quanto à distribuição dos neoplasmas mamários das 62 gatas, 46,8% apresentaram tumores únicos e 52,2% apresentaram mais de um tumor, sendo que 32,2% eram tumores múltiplos e 21% multifocais. Os carcinomas tubulares, carcinomas sólidos e cribriformes, foram os mais frequentes como massas únicas e multifocais e foram os tumores que apareceram em maior frequência em combinação com outros tumores. As gatas com tumores múltiplos tiveram em sua maioria a combinação de dois tipos histológicos. A remoção e avaliação de todos os nódulos mamários possibilita determinar os tipos histológicos envolvidos e auxilia o clínico sobre a melhor conduta terapêutica.

Palavras-chave: Carcinomas; Tumores em felinos; Glândula mamária; Neoplasmas.

**ABSTRACT:** This study aimed to describe feline mammary neoplastic and non-neoplastic lesions, as for their distribution and histological type. The results of biopsy and necropsy examinations performed on queens clinically diagnosed with mammary tumors dispatched to the Veterinary Oncological Service – UFPEL (SOVET-UFPEL) were assessed. Data were categorized according to the breed, age, and histological type. All animals with mammary tumors were female, and were predominantly old and of mixed breed queens. One hundred and fifty-six diagnostics were performed into 70 queens (8 queens had non-neoplastic lesions and 62 had neoplastic lesions). Of these, 40 were non-neoplastic alterations, 3 benign tumors and 113 were malignant tumors. In this study the most frequent non-neoplastic alterations were adenosis and duct ectasia. All of the benign tumors were adenomas and the most frequent malignant neoplasms were tubular, solid, and cribriform carcinomas. As for the distribution of the mammary neoplasms, out of the 62 queens, 46.8% had single tumors and 52.2% had more than one tumor, wherein 32.2% were multiple tumors and 21% were multifocal. Tubular carcinomas, solid and cribriform carcinomas were more frequent as single and multifocal masses and were the tumors that occurred more frequently in combination with other tumors. Queens with multiple tumors had mostly the combination of two histological types. The removal and assessment of all mammary nodules enable the determination of the involved histological types and aid clinicians to take the best therapeutic approaches.

**Keywords:** Carcinoma; Feline tumors; Mammary gland; Neoplasms.

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são muito comuns em caninos e felinos e também em seres humanos (Cassali et al., 2011; Cunha et al., 2017; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). Existem muitos estudos sobre tumores de mama em cadelas, enquanto estudos sobre tumores de mama de gatas tem aumentado, visto as suas similaridades com as neoplasias mamárias de mulheres (Cassali et al., 2018; Togni et al., 2013; Zappulli et al., 2005). Nas gatas estes neoplasmas são o terceiro tipo mais comum, atrás apenas dos tumores hematopoiéticos e cutâneos (Cassali et al., 2018; Togni et al., 2013; Winston et al., 2005). Representam 14% a 17% do total de tumores e seu comportamento biológico difere do observado para os cães (Borrego; Cartagena; Engel, 2009; Misdorp, 2002; Togni et al., 2013).

De 80 a 96% dos tumores mamários felinos são malignos no momento do diagnóstico, e a maioria destes são carcinomas. O prognóstico é ruim e o tempo médio de sobrevida é inferior a um ano (Cassali et al., 2020, 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017; Togni et al., 2013). Os carcinomas mamários felinos são localmente invasivos para tecidos circundantes (Misdorp, 2002; Seixas et al., 2011). Neoplasmas benignos, como os adenomas, também são diagnosticados porém com menor frequência e além destes, outras alterações não neoplásicas podem ser encontradas como hiperplasias, alteração fibroadenomatosa, ectasia ductal e displasias (De Souza et al., 2018).

Muitas gatas têm uma ou mais massas pequenas dentro das mamas, o envolvimento de várias glândulas mamárias é frequente, e não há predisposição para o surgimento de neoplasias em alguma mama específica, porém as glândulas mamárias abdominais tem sido as mais acometidas, assim como ocorre nas cadelas (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). Massas neoplásicas solitárias podem estar acompanhadas de alterações displásicas nas mamas não envolvidas (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017).

Muitos estudos citam a ocorrência de várias massas tanto em cadelas como em gatas, porém nenhum estudo ainda especificou os tipos de tumores mais encontrados de acordo com a sua distribuição e possíveis combinações. Esses dados podem ser de especial interesse, visto a importância do diagnóstico correto e avaliação prognóstica das pacientes. Desta forma, este trabalho teve por objetivo determinar a prevalência dos neoplasmas mamários felinos diagnosticados no Serviço de Oncologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (SOVET/UFPel), de 2010 a 2020, assim, identificar as alterações encontradas nas mamas, relatar a frequência dos neoplasmas mamários benignos e malignos e por fim determinar e discutir sobre as diferentes combinações a fim de estabelecer as relações dos neoplasmas encontrados, auxiliando assim clínicos e patologistas na conduta diagnóstica.

## 2. METODOLOGIA

Foi realizado um levantamento da casuística de tumores de mama em gatas encaminhados para diagnóstico anatomopatológico para o SOVET/UFPel entre os anos de 2010 e 2020, como biópsias e necropsias. Foram avaliados todos os protocolos e cada diagnóstico foi considerado resultando então num número maior de tumores em relação ao número de animais.

Para a realização do levantamento, foram considerados os diagnósticos constatados nos protocolos originais dos arquivos. Os dados das gatas foram categorizados de acordo com sua raça, idade e diagnóstico anatomopatológico. As amostras tumorais foram classificadas histologicamente conforme preconizado por Goldschmidt et al., 2011 e Cassalli, et al., 2018.

Após a classificação histológica, realizou-se a categorização dos tumores quanto a sua distribuição em focais, multifocais e múltiplos. A distribuição dos neoplasmas benignos e malignos foi definida como: 1) tumores únicos quando apenas uma massa foi encontrada; 2) multifocais quando havia mais de um tumor do mesmo tipo histológico ou 3) múltiplos quando

havia mais de uma massa de diferentes tipos histológicos. Para esta avaliação foram censurados os tumores mamários não neoplásicos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período avaliado, 70 gatas apresentaram diagnóstico de alterações não neoplásicas e de neoplasmas mamários, resultando em 156 diagnósticos, uma vez que um número significativo delas apresentava mais de uma alteração e/ou tumor. Destes diagnósticos, 116 eram de tumores malignos e benignos e 40 eram alterações não neoplásicas. Dentre estas, 62 gatas apresentaram neoplasmas malignos e benignos e 8 gatas apresentaram apenas alterações não neoplásicas, conforme a tabela 1.

Dos animais analisados, todos eram fêmeas com idades que variavam de 6 meses a 21 anos, com mediana de 10 anos. A idade de sete animais não foi informada. A incidência de tumores de mama em gatas é alta em gatas com idade média de 10 e 11 anos (Cassali et al., 2018; Misdorp, 2002; Togni et al., 2013). Quanto a raça, 59 eram sem raça definida, 10 eram siamesas e uma himalaia. Houve um predomínio de animais sem raça definida em nosso estudo correspondendo a 84,3% das gatas. No Brasil não há dados sobre predisposição de raça, pois a maioria dos animais no Brasil são animais sem raça definida (Cassali et al., 2018; Cunha et al., 2017; Togni et al., 2013).

Quanto à frequência dos tumores, houve um predomínio de neoplasias malignas [72,43% (113/156)], porcentagem bem maior em relação às neoplasias benignas que representou apenas 1,9% (3/156) dos diagnósticos. O número de neoplasmas benignos também foi menor que as alterações não neoplásicas que corresponderam 25,64% (40/156) das lesões. No levantamento realizado por TOGNI et al. (2013) a frequência de tumores benignos também foi baixa, representando 5,06% dos 217 tumores avaliados, assim como no estudo de SPADER

(2009) onde dos 55 neoplasmas de gatas estudados, apenas 3 eram adenomas. Os adenomas são tumores benignos com arranjo composto por estruturas acinares apresentando uma camada de células epiteliais e mioepiteliais, circundada por membrana basal (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017).

As lesões não neoplásicas da mama são de alta prevalência, porém ainda pouco diagnosticadas. Sua ocorrência demonstra risco para transformação neoplásica, principalmente sob influência hormonal (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). Neste estudo, 25,64% das lesões (40/156) foram de alterações não neoplásicas, onde a adenose, a ectasia ductal e a alteração fibroadenomatosa foram as mais frequentes, semelhante ao estudo realizado por Togni et al. (2013) onde 22,58% eram alterações não neoplásicas. Com exceção da alteração fibroadenomatosa, todas as demais lesões não neoplásicas podem ocorrer como entidades únicas nas mamas das gatas ou estarem acompanhadas de neoplasmas benignos ou malignos na mesma mama ou em mamas adjacentes (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). Neste estudo, 67,5% (27/40) das alterações não neoplásicas estavam acompanhadas de tumores malignos. A alteração fibroadenomatosa mamária tende a ocorrer em animais jovens, com menos de 3 anos de idade, sendo uma alteração comum em felinos, associada ao ciclo hormonal nas gatas jovens ou por alterações hormonais causadas pelo uso de acetato de megestrol e/ou acetato de medroxiprogesterona (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017; Togni et al., 2013). As demais alterações não neoplásicas ocorreram em animais de qualquer idade.

Sabe-se que os tumores mamários nas gatas são menos diversificados que das cadelas, e estes tumores geralmente são malignos, de grau elevado e comportamento biológico agressivo (Zappulli et al., 2013), porém os carcinomas ductais e carcinomas papilares intraductais têm um comportamento menos agressivo em relação aos demais tipos histológicos malignos (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017), porém neste estudo, foram mais frequentes os carcinomas

tubulares, sólidos e cribriforme, semelhante ao que é citado na literatura (Cassali et al., 2018; Millanta et al., 2002; Togni et al., 2013).

O carcinoma tubular vem sendo relatado como o mais frequente em cadelas e gatas, e é caracterizado por proliferação epitelial disposta de forma predominantemente tubular (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017) e considerado um neoplasma maligno invasivo (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017; Togni et al., 2013). O segundo tumor de maior prevalência neste estudo foi o carcinoma sólido, o qual é constituído por células epiteliais que formam cordões ou ninhos de células, sem formação de luz tubular. Áreas de necrose e índice mitótico elevado são comuns (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). O carcinoma cribriforme, terceiro mais frequente, é caracterizado pela proliferação de células epiteliais neoplásicas formando um arranjo semelhante a uma peneira. A luz tubular é muito escassa cercada por pontes de células neoplásicas (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017). Este neoplasma é altamente invasivo, com prognóstico reservado (Misdorp, 2002).

Além disso, gatas e cadelas podem ter um ou vários tumores nas glândulas mamárias e podem ocorrer como tumores epiteliais, mesenquimais e/ou mistos (Hellmén et al., 2000). Na tabela 2 é demonstrada a distribuição quantitativa dos tipos histológicos dos neoplasmas únicos, múltiplos e multifocais das 62 gatas.

Foram considerados como únicos quando os neoplasmas ocorreram como massas individuais, multifocais aqueles que apresentaram mais de um nódulo do mesmo tipo histológico e múltiplos os tumores de tipos histológicos distintos. Um estudo considerou os carcinomas mamários como únicos, múltiplos (dentro de uma determinada glândula mamária) e multicêntricos (afetando mais de uma glândula mamária) porém não definiu os tipos histológicos envolvidos (Dagher et al., 2019). Neste estudo preferiu-se fazer a distinção dos animais com mais de um tumor em múltiplos e multifocais em vez do termo multicêntrico. É discutível se tumores múltiplos e multifocais tem origem na disseminação linfática ou

hematógena de um único tumor primário ou se são tumores primários simultâneos (Zappulli et al., 2005).

Neste estudo, 33 dos animais avaliados com neoplasias apresentaram mais de um tumor mamário maligno e/ou combinação de benigno e maligno, representando 53,4% do total de animais avaliados. Esse dado é bastante significativo, pois aproximadamente metade dos animais apresentam mais de um nódulo. Nesse estudo, 53,22% das gatas apresentaram dois ou mais neoplasmas de um tipo histológico combinado ou não com outro tipo histológico, apresentando vários nódulos em uma cadeia mamária. Sabe-se que tumores podem ocorrer isoladamente em mamas ipsilaterais, na mesma mama ou em cadeias mamárias adjacentes.

Múltiplas massas mamárias envolvendo várias glândulas são comuns em felinos, geralmente envolvendo uma única cadeia mamária, porém podem ocorrer bilateralmente (Cassali et al., 2018; Dagher et al., 2019; Morris, 2013). A literatura diverge quanto ao número de massas encontradas nas mamas no momento do diagnóstico. Segundo Gameiro et al. (2020), 60% das gatas têm mais de um tumor no momento do diagnóstico, porém estes dados diferem do encontrado em outro estudo, onde 57,7% das gatas foram relatadas como tendo uma única massa (Mills et al., 2015).

Os carcinomas tubulares, carcinomas sólidos e cribriformes, foram os mais frequentes como massas únicas e multifocais. Estes neoplasmas também foram os tumores que apareceram em maior frequência em combinação com outros tumores (múltiplos), como os carcinomas ductais e os carcinomas papilares intraductais que em comparação com os tumores mais frequentes, têm comportamento menos agressivo (Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017), assim como estes neoplasmas ocorreram em combinação com os carcinomas in situ, que não apresentam invasão de membrana basal (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017).

Os neoplasmas de diferentes tipos histológicos, de modo geral, apresentam características histológicas, estadiamento patológico e comportamento biológico distintos entre si. Os carcinomas tubulopapilares apresentam um melhor tempo de sobrevivência em comparação aos sólidos e micropapilares (Seixas et al., 2011). Além do tipo histológico, o grau histológico é considerado um importante fator prognóstico para tumores mamários de gatas (Cassali et al., 2018; Cunha et al., 2017; Mendes et al., 2007; Seixas et al., 2011). A graduação pode variar nos distintos nódulos de uma cadeia mamária, mesmo que os neoplasmas sejam do mesmo tipo histológico (Mendes et al., 2007).

Deste modo, todos os nódulos excisados cirurgicamente, sejam eles por mastectomia parcial, radical ou lumpectomia devem ser avaliados através da histopatologia, uma vez que neoplasmas malignos de felinos tendem a ser pequenos e de alto grau histológico e muitas vezes estão acompanhados de outras alterações mamárias de comportamento biológico menos agressivo como tumores benignos e alterações não neoplásicas (Cassali et al., 2018; Goldschmidt; Peña; Zappulli, 2017; Togni et al., 2013). O envio de toda a peça cirúrgica excisada promove o diagnóstico correto de todos os nódulos, quando incluindo as mamas sem evidência macroscópica de tumores, estas também devem ser analisadas, pois as glândulas podem apresentar alterações inflamatórias, hiperplásicas ou displásicas, incluindo microinvasão neoplásica não detectada na macroscopia, que podem definir o comportamento patológico (Cassali et al., 2018), auxiliando os clínicos na escolha terapêutica adequada e no estabelecimento de um prognóstico mais fidedigno.

#### 4. CONCLUSÕES

Tumores múltiplos e multifocais foram os mais frequentes neste estudo, onde os tipos histológicos mais encontrados foram o carcinoma tubular, sólido e cribriforme. Foi observada

a associação de neoplasmas menos agressivos e alterações não neoplásicas com as formas mais agressivas, demonstrando a necessidade da avaliação de todos os nódulos e todas as mamas, para que desta forma seja realizado o correto diagnóstico para instituição da terapêutica adequada.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORREGO, J. F.; CARTAGENA, J. C.; ENGEL, J. Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): A retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Veterinary and Comparative Oncology*, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 213–221, 2009. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2009.00194.x.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 153–180, 2011.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 555–574, 2020. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135084.
- CUNHA, S. C. S.; CORGOZINHO, K. B.; DE SOUZA, H. J. M.; DA SILVA, K. V. G. C.; LEITE, J. da S.; DE MELLO, M. F. V.; FERREIRA, A. M. R. Retrospective study on survival time of cats with mammary carcinomas undergoing surgery alone or with adjuvant chemotherapy. *World's Veterinary Journal*, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 30–35, 2017. DOI: 10.5455/wvj.20170491.
- DAGHER, E.; ABADIE, J.; LOUSSOUARN, D.; CAMPONE, M.; NGUYEN, F. Feline Invasive Mammary Carcinomas: Prognostic Value of Histological Grading. *Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 660–670, 2019. DOI: 10.1177/0300985819846870.
- DE SOUZA, T. A.; DE CAMPOS, C. B.; DE BIASI, B. G. A.; NUNES, F. C.; MONTEIRO, L. N.; DE OLIVEIRA, V. R.; CASSALI, G. D. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, [S. l.], v. 119, n. 2017, p. 209–214, 2018. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.06.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.06.012>.

- GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN D.J. (org.). *Tumors in Domestic Animals*. 5. ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. p. 723–765.
- HELLMÉN, E.; MOLLER, M.; BLANKENSTEIN, M. A.; ANDERSSON, L.; WESTERMARK, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. *Breast Cancer Research and Treatment*, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 197–210, 2000. DOI: 10.1023/A:1006410020384.
- MENDES, T. C.; GUIM, T. N.; DIAS, M. F.; BONEL-RAPOSO, J.; FERNANDES, C. G. Comparação entre os sistemas histomorfológico e de graduação histológica para classificação prognóstica de tumores mamários em cadelas. *Acta Scientiae Veterinariae*, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 339, 2007. DOI: 10.22456/1679-9216.16126.
- MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. MIB-1 Labeling Index in Feline Dysplastic and Neoplastic Mammary Lesions and Its Relationship with Postsurgical Prognosis. *Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 120–126, 2002. DOI: 10.1354/vp.39-1-120.
- MILLS, S. W. et al. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015. DOI: 10.1177/0300985814543198.
- MISDORP, W. *Tumors of the Mammary Gland*. Fourth Edition. 2002. DOI: 10.1002 / 9780470376928. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470376928.ch12>.
- MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 391–400, 2013. DOI: 10.1177/1098612X13483237.
- SEIXAS, F.; PALMEIRA, C.; PIRES, M. A.; BENTO, M. J.; LOPES, C. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, [S. l.], v. 187, n. 1, p. 65–71, 2011. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.10.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.030>.
- SPADER, M. B. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E FATORES PROGNÓSTICOS PELA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs EM TUMORES MAMÁRIOS FELINOS. [S. l.], n. December, p. 58, 2009.

TOGNI, M.; MASUDA, E. K.; KOMMERS, G. D.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 353–358, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000300013.

WINSTON, J.; CRAFT, D. M.; SCASE, T. J.; BERGMAN, P. J. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 8–15, 2005. DOI: 10.1111/j.1476-5810.2005.00063.x.

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; RASOTTO, R.; FERRO, S.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. Proposed Classification of the Feline “Complex” Mammary Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1070–1077, 2013. DOI: 10.1177/0300985813488894.

ZAPPULLI, V.; DE ZAN, G.; CARDAZZO, B.; BARGELLONI, L.; CASTAGNARO, M. Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, [S. l.], v. 72, n. SPEC. ISS., p. 98–106, 2005. DOI: 10.1017/S0022029905001263.

Tabela 1 – Frequência das alterações neoplásicas e não neoplásicas em 70 gatas:

<b>Diagnóstico</b>	<b>Nº de gatas acometidas</b>	<b>Nº de tumores</b>	<b>Frequência de tumores %</b>
<b>Neoplasmas malignos</b>			
Carcinoma tubular	28	41	36,3
Carcinoma sólido	23	33	29,2
Carcinoma cribriforme	17	24	21,2
Carcinoma papilar	6	7	6,2
Carcinoma anaplásico	1	1	0,9
Carcinoma de células escamosas	1	1	0,9
Carcinoma ductal in situ	1	1	0,9
Carcinoma in situ	1	1	0,9
Carcinoma lobular in situ	1	2	1,8
Carcinoma complexo	1	1	0,9
Carcinoma rico em lipídeos	1	1	0,9
<i>Total</i>	-	<i>113</i>	<i>100</i>
<b>Neoplasmas benignos</b>			
Adenoma	3	3	100
<i>Total</i>	-	<i>3</i>	<i>100</i>
<b>Alterações não neoplásicas</b>			
Adenose	9	14	35
Alteração fibroadenomatosa	5	9	22,5
Ectasia ductal	8	11	27,5
Hiperplasia de células colunares	1	5	12,5
Hiperplasia ductal	1	1	2,5
<i>Total</i>	-	<i>40</i>	<i>100</i>

Tabela 2. Principais tipos e associações de tumores mamários malignos e benignos diagnosticados em gatas:

<b><i>Tumores Mamários Múltiplos</i></b>	<b><i>Nº de animais</i></b>	<b><i>%</i></b>
Carcinoma sólido + Carcinoma tubular	8	40%
Carcinoma cribriforme + Carcinoma tubular	3	15%
Carcinoma tubular + Carcinoma papilar	2	10%
Carcinoma cribriforme + Carcinoma lobular <i>in situ</i>	1	5%
Carcinoma sólido + Carcinoma <i>ductal in situ</i>	1	5%
Carcinoma sólido + Adenomioepitelioma maligno	1	5%
Carcinoma sólido + Carcinoma tubular + Adenoma	1	5%
Carcinoma sólido + Carcinoma cribriforme + Carcinoma papilar	1	5%
Carcinoma sólido + Carcinoma papilar	1	5%
Carcinoma tubular + Carcinoma <i>in situ</i>	1	5%
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100%</b>
<b><i>Tumores mamários multifocais</i></b>		
Carcinoma cribriforme	5	38,46%
Carcinoma tubular	5	38,46%
Carcinoma sólido	3	23,08%
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100%</b>
<b><i>Tumores mamários únicos</i></b>		
Carcinoma tubular	8	27,58%
Carcinoma sólido	8	27,58%
Carcinoma cribriforme	6	20,68%
Carcinoma papilar	2	6,89%
Carcinoma anaplásico	1	3,4%
Carcinoma complexo	1	3,4%
Carcinoma de células escamosas	1	3,4%
Carcinoma rico em lipídeos	1	3,4%
Adenoma	1	3,4%
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>100%</b>
<b>Total</b>	<b>62</b>	

## **2.2 Artigo 2**

### **Células inflamatórias infiltrantes: Perfil e distribuição em carcinomas mamários de gatas**

Michele Berselli, Thomas Normanton Guim, Clarissa Caetano de Castro, Luísa Grecco Corrêa, Andressa Dutra Piovesan Rossato, Luísa Mariano Cerqueira da Silva, Fabiane Borelli Grecco Fabio Raphael Pascoti Bruhn, & Cristina Gevehr Fernandes

Aceito para publicação na revista Research, Society and Development

## **Células inflamatórias infiltrantes: Perfil e distribuição em carcinomas mamários de gatas**

**Infiltrating inflammatory cells: Profile and distribution in feline mammary carcinomas**

**Células inflamatorias infiltrantes: Perfil y distribución en carcinomas mamarios de gatas**

Recebido: 16/03/2021 | Revisado: 20/03/2021 | Aceito: 21/01/2021 | Publicado: 27/03/2021

### **Michele Berselli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0563-4139>  
 Universidade de Santa Cruz do Sul, Brasil  
 E-mail: [michele.berselli@gmail.com](mailto:michele.berselli@gmail.com)

### **Thomas Normanton Guim**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8278-1397>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [thomasguim@hotmail.com](mailto:thomasguim@hotmail.com)

### **Clarissa Caetano de Castro**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4822-034X>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [clarissac.decastro@gmail.com](mailto:clarissac.decastro@gmail.com)

### **Lúisa Grecco Corrêa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1355-2907>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [luisagcorrea@gmail.com](mailto:luisagcorrea@gmail.com)

### **Andressa Dutra Piovesan Rossato**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5760-9392>  
 Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai campus Bagé, Brasil  
 E-mail: [andressa-piovesan@hotmail.com](mailto:andressa-piovesan@hotmail.com)

### **Lúisa Mariano Cerqueira da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6158-4204>  
 E-mail: [luisamarianovet@yahoo.com.br](mailto:luisamarianovet@yahoo.com.br)

### **Fabiane Borelli Grecco**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3996-315X>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [fabianegrecco18@gmail.com](mailto:fabianegrecco18@gmail.com)

### **Fabio Raphael Pascoti Bruhn**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4191-965X>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [fabio\\_rpb@yahoo.com.br](mailto:fabio_rpb@yahoo.com.br)

### **Cristina Gevehr Fernandes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-2099>  
 Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
 E-mail: [crisgevf@yahoo.com.br](mailto:crisgevf@yahoo.com.br)

## **Resumo**

Tumores mamários malignos têm um número relativamente alto de linfócitos T infiltrantes. Atualmente, os linfócitos B infiltrados em tumores têm sido reconhecidos como um potencial marcador no câncer de mama humano. Este estudo teve como objetivo relacionar fatores prognósticos de tumores mamários ao padrão de infiltrado inflamatório em gatas. Foram analisados protocolos de 38 animais diagnosticados com tumor mamário e obtido dados sobre sexo, idade e raça. As amostras foram avaliadas quanto a distribuição, tipo histológico, tamanho, grau histológico, metástase linfonodal, distribuição celular inflamatória e intensidade da inflamação. Para marcação imunoistoquímica, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-CD79a. Houve predomínio de gatas idosas e sem raça definida. Carcinomas tubulares, sólidos e cribriformes foram os mais diagnosticados. Tumores de grau III menores que 2,0 cm foram frequentes. O infiltrado inflamatório total era predominantemente multifocal e de baixa contagem,

independientemente do tipo histológico, grau e tamanho. Os linfócitos foram as células mais frequentes e de baixa contagem. A imunocoloração CD79a foi observada na maioria dos neoplasmas, mostrando que linfócitos B e plasmócitos são componentes integrais do infiltrado inflamatório do tumor e de distribuição predominantemente difusa. Células CD79a positivas apresentaram diferenças significativas para distribuição ( $p=0,038$ ), no tamanho ( $p = 0,045$ ) e invasão linfática ( $p = 0,039$ ). Este é o primeiro estudo a quantificar as células inflamatórias do microambiente tumoral mamário de gatas e revela resultados iniciais promissores. As células CD79a positivas constituem uma parcela significativa da população linfocitária do microambiente tumoral e fazem parte da resposta inflamatória associada ao tumor em carcinomas mamários felinos.

**Palavras-chave:** Felino; Infiltrado inflamatório; Linfócito; Tumor mamário.

#### Abstract

Malignant mammary tumors have a relatively high number of infiltrating T lymphocytes. Currently, B lymphocytes infiltrated in tumors have been recognized as a potential marker in human breast cancer. The aim of this study was to relate prognostic factors of mammary tumors to the pattern of inflammatory infiltrate in cats. Protocols of 38 animals diagnosed with mammary tumor were analyzed and data on sex, age and race were obtained. The samples were evaluated for distribution, histological type, size, histological grade, lymph node metastasis, inflammatory cell distribution and intensity of inflammation. For immunohistochemical staining, anti-CD79a monoclonal antibody was used. There was a predominance of elderly and mixed breed cats. Tubular, solid and cribriform carcinomas were the most diagnosed. Grade III tumors smaller than 2.0 cm were frequent. The total inflammatory infiltrate was predominantly multifocal and of low count, regardless of the histological type, degree and size. Lymphocytes were the most frequent and low-count cells. CD79a immunostaining was observed in most neoplasms, showing that B lymphocytes and plasma cells are integral components of the inflammatory infiltrate of the tumor and of predominantly diffuse distribution. Positive CD79a cells showed significant differences in distribution ( $p = 0.038$ ), in size ( $p = 0.045$ ) and lymphatic invasion ( $p = 0.039$ ). This is the first study to quantify inflammatory cells in the mammary tumor microenvironment of cats and reveals promising initial results. CD79a positive cells constitute a significant portion of the lymphocyte population in the tumor microenvironment and are part of the tumor-associated inflammatory response in feline breast carcinomas.

**Keywords:** Feline; Inflammatory infiltrate; Lymphocyte; Mammary tumor.

#### Resumen

Los tumores de mama malignos tienen un número relativamente alto de linfocitos T infiltrantes. Actualmente, los linfocitos B infiltrados en tumores se han reconocido como un marcador potencial en el cáncer de mama humano. Este estudio tuvo como objetivo relacionar los factores pronósticos de los tumores de mama con el patrón de infiltrado inflamatorio en gatos. Se analizaron protocolos de 38 animales diagnosticados con tumor de mama y se obtuvieron datos sobre sexo, edad y raza. Las muestras se evaluaron en cuanto a distribución, tipo histológico, tamaño, grado histológico, metástasis ganglionar, distribución de células inflamatorias e intensidad de la inflamación. Para la tinción inmunohistoquímica, se utilizó anticuerpo monoclonal anti-CD79a. Hubo un predominio de gatos ancianos y mestizos. Los carcinomas tubulares, sólidos y cribiformes fueron los más diagnosticados. Fueron frecuentes los tumores de grado III menores de 2,0 cm. El infiltrado inflamatorio total fue predominantemente multifocal y de bajo recuento, independientemente del tipo histológico, grado y tamaño. Los linfocitos fueron las células más frecuentes y de menor recuento. Se observó inmunotinción de CD79a en la mayoría de las neoplasias, lo que demuestra que los linfocitos B y las células plasmáticas son componentes integrales del infiltrado inflamatorio del tumor y de distribución predominantemente difusa. Las células CD79a positivas mostraron diferencias significativas en la distribución ( $p = 0.038$ ), en tamaño ( $p = 0.045$ ) e invasión linfática ( $p = 0.039$ ). Este es el primer estudio que cuantifica las células inflamatorias en el microambiente del tumor mamario de los gatos y revela resultados iniciales prometedores. Las células CD79a positivas constituyen una porción significativa de la población de linfocitos en el microambiente tumoral y son parte de la respuesta inflamatoria asociada al tumor en los carcinomas de mama felinos.

**Palabras clave:** Felino; Infiltrado inflamatório; Linfocito; Tumor mamario.

## 1. Introdução

As neoplasias mamárias são descritas como o terceiro tipo mais frequente de tumor em felinos cujo prognóstico varia de reservado a ruim, devido sua agressividade (Cassali et al., 2018; Cassali et al., 2020). Vários parâmetros são considerados importantes indicadores prognósticos para estes neoplasmas, tais como: idade, tamanho primário do tumor, comprometimento de linfonodos, número de mitoses, extensão da necrose, margens cirúrgicas e tipo de invasão (Goldschmidt, Peña & Zappulli, 2017; Zappulli et al., 2015). Além disso, outro fator que pode estar envolvido na progressão tumoral é a resposta inflamatória associada ao tumor (Carvalho et al., 2011; Franzoni et al., 2019; O'Neill et al., 2009).

Os tumores mamários malignos são frequentemente associados a um número relativamente alto de linfócitos infiltrantes (Carvalho et al., 2016). O significado prognóstico do infiltrado de linfócitos T em tumores tem sido amplamente aceito em neoplasmas humanos e caninos, uma vez que cães com alto nível de infiltrado inflamatório e linfócitos T nos tecidos tumorais apresentaram menor tempo de sobrevivência (Carvalho et al., 2016; Franzoni et al., 2019; Lopes-Neto et al., 2017; Wouters & Nelson, 2018). Dados a respeito do infiltrado de linfócitos em neoplasmas de felinos são escassos. Em cães, sabe-se que os tumores mamários malignos são caracterizados por infiltração acentuada de linfócitos, não sendo observados linfócitos no tecido mamário normal e em tumores benignos, o que sugere que linfócitos, principalmente os linfócitos T, desempenham um papel importante tanto na progressão como na supressão tumoral. Além disso, um número expressivo de células B está associado a um comportamento tumoral agressivo em cães e os linfócitos B se infiltraram mais profundamente no tecido do que as células T (Kim, Yu, Yhee, Im & Sur, 2010; Kim, Chon, Im, Kim, & Sur, 2013; Lopes-Neto et al., 2017; Souza et al., 2018).

Atualmente os linfócitos B infiltrantes em tumores têm sido reconhecidos como um potencial marcador em câncer de mama humano (Shen, Wang & Ren, 2018). As células B desempenham um papel importante na modulação da resposta imune ao câncer e são a segunda população de linfócitos infiltrantes de tumor mais abundante (Yuen, Demissie & Pillai, 2016). As células B no câncer humano podem desempenhar papéis distintos, podendo inibir o desenvolvimento do tumor pela produção de anticorpos, ativação de células NK, estimular a fagocitose por macrófagos e ainda pela ativação de células CD4+ e CD8+, podendo representar uma resposta de anticorpos contra antígenos nos tumores da mama em humanos ou ao contrário, podem promover o desenvolvimento tumoral suprimindo as respostas das células T citotóxicas (Mahmoud et al., 2012; Yuen et al., 2016).

Em gatos, é provável que linfócitos T, células B e plasmócitos possam participar da regulação negativa do crescimento tumoral em carcinomas de células escamosas (Pérez, Day, Martín, González & Mozos, 1999). Dados a respeito do papel dos linfócitos em tumores mamários de felinos não são conhecidos, portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar e descrever o perfil de distribuição de linfócitos, e realizar a análise imunoistoquímica dos linfócitos B e plasmócitos (CD79a positivos) no infiltrado inflamatório dos neoplasmas mamários de felinos e determinar se as características desse infiltrado estavam relacionadas com o comportamento biológico dos tumores.

## 2. Metodologia

### 2.1. Levantamento de dados

Foi realizado um estudo retrospectivo referente aos tumores mamários de gatas do Serviço de Oncologia

Veterinária/ de Pelotas (SOVET/ UFPEL) desde 2014, do qual resultaram em dados de 38 gatas totalizando 77 casos de neoplasmas mamários. Foram tabuladas as seguintes informações: idade, raça, diagnósticos morfológico e histológico, número de tumores, tamanho e grau histológico e avaliação das células inflamatórias associadas ao tumor (distribuição das células inflamatórias, intensidade do infiltrado inflamatório total e intensidade do infiltrado inflamatório linfocitário).

## **2.2. Classificação das amostras tumorais**

Foi realizado inicialmente o levantamento dos neoplasmas mamários. Os tumores foram classificados como únicos, múltiplos e multifocais. Foram considerados multifocais aqueles que apresentaram nódulos do mesmo tipo histológico e múltiplos aqueles que apresentaram neoplasmas de diferentes tipos histológicos, podendo ter combinações de diferentes tumores malignos ou combinações de benignos e malignos.

As amostras foram classificadas histologicamente conforme preconizado pela literatura (Cassali et al., 2020; Goldschmidt et al., 2017). Foram incluídas no estudo amostras classificadas como carcinomas mamários, considerando-se os tipos histológicos comuns da glândula mamária de gatas (Cassali et al., 2020; Goldschmidt et al., 2017).

O grau histológico foi definido de acordo com Elston & Ellis (1991), e se baseia no somatório dos escores de três parâmetros: formação tubular, pleomorfismo celular e índice mitótico. O tamanho dos tumores foi definido através da mensuração em centímetros da massa tumoral em três dimensões (Comprimento x Largura x Altura), sendo considerado para avaliação o maior valor. Os neoplasmas foram classificados através dos valores de tamanho para tumores mamários em felinos onde T1 é atribuído a neoplasmas de 0 a <2 cm, T2 corresponde a tumores medindo 2 a 3 cm e T3 corresponde a tumores com mais de 3 cm (Cassali et al., 2020).

## **2.3. Avaliação do Infiltrado inflamatório**

A avaliação das células inflamatórias associadas ao tumor nos carcinomas mamários foi realizada levando em consideração três parâmetros distintos: distribuição das células inflamatórias, intensidade do infiltrado inflamatório total e intensidade do infiltrado inflamatório linfocitário. A distribuição do infiltrado inflamatório total nos carcinomas mais frequentes (tubular, sólido e cribriforme), foi classificada nas áreas periféricas e intratumorais em: i) focal: presença de 1-3 focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de três focos inflamatórios e iii) difusa: presença de células inflamatórias uniformemente distribuídas na secção de tumor (Estrela-Lima et al., 2010; Lopes-Neto et al., 2017).

A intensidade do infiltrado inflamatório total e a intensidade linfocitária foi analisado nos carcinomas tubulares, cribriformes e sólidos de gatas com tumores únicos e multifocais. Estes foram categorizados em dois subgrupos cada um: baixa contagem (<800 linfócitos) e alta contagem (>800 linfócitos), com base na análise do infiltrado inflamatório (Estrela-Lima et al., 2010; Lopes-Neto et al., 2017).

Os dados acerca dos parâmetros de inflamação foram obtidos com a avaliação de cinco campos mais representativos (“hot spots”) em cortes histológicos de 4µm coradas pelo Hematoxilina Eosina (HE) em aumento de 400x. Para tal, foi realizada a contagem das células inflamatórias em imagens capturadas em câmera digital adaptada a um Microscópio Olympus CX-21.

## 2.4. Imunoistoquímica

A imunomarcção para CD79a foi realizada para detecção de linfócitos B e plasmócitos em cortes desparafinados de 3µm em lâminas positivadas. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. A recuperação antigênica foi realizada em micro-ondas em solução de TRIS EDTA. Posteriormente os cortes foram tratados com solução de leite em pó desnatado 5% para o bloqueio das ligações inespecíficas (background). Foi utilizado o anticorpo CD79a monoclonal (CM067A – BIOCARE®) na diluição 1:150 e os cortes foram incubados em câmara úmida por 12-14 horas (overnight) a 4 ° C. Após a incubação, utilizou-se o sistema de detecção por peroxidase (HRP) utilizando o kit Mouse-on-Canine (Promark - BIOCARE®), por 60 minutos. Posteriormente, a cor foi revelada com tetrahydrocloro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a 0,05% com 1ml de tampão e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. O anticorpo primário foi substituído por PBS nos controles negativos e controles positivos consistiram de seções de linfonodos.

As amostras foram avaliadas semiquantitativamente, sendo o infiltrado categorizado como: Ausente - sem células B ou plasmócitos detectáveis; Difuso - células B ou plasmócitos espalhados nos focos de infiltrado inflamatório por todo o tumor; Agregados - células organizadas em folículos e/ou agregados densos, baseado nos critérios descritos por Knief et al. (2016). A presença de células CD79a+ foi também avaliada quanto o padrão de distribuição no estroma tumoral em focal, multifocal e difuso. Além disso, as amostras marcadas por imunoistoquímica foram avaliadas quantitativamente, através da contagem sequencial em 10 campos aleatórios, não adjacentes, em objetiva de 400x, obtendo-se uma média da contagem de células CD79a+, conforme metodologia adaptada de Estrela-Lima (2010) e Knief et al., (2016).

## 2.5. Critérios de inclusão/exclusão de amostras

Para o levantamento de dados epidemiológicos, morfológicos e de localização dos neoplasmas, todas as amostras foram incluídas na análise. Para a avaliação do grau, tamanho, distribuição e média de células inflamatórias e linfocitárias, foram incluídos todos os neoplasmas diagnosticados como carcinomas tubulares sólidos e cribriformes por serem os tumores mais frequentemente diagnosticados nas gatas. Foram censurados tumores benignos e alterações não neoplásicas.

Para a análise da intensidade do infiltrado inflamatório, linfocitário e imunoistoquímica, foram incluídas na análise apenas os neoplasmas de animais com tumores únicos e multifocais, e os tipos histológicos mais frequentes: carcinomas tubulares, sólidos e cribriformes. Foram censurados os nódulos de gatas com neoplasmas múltiplos e os que apresentaram recidivas de tipos histológicos diferentes, devido à variabilidade de tipos histológicos no mesmo animal.

## 2.6. Estatística

A categorização dos neoplasmas mamários quanto a raça, idade, comportamento biológico, tipo histológico, grau, tamanho, distribuição e intensidade do infiltrado inflamatório total e infiltrado linfocitário foram expressas como porcentagem. Para a análise quantitativa dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente utilizado para verificar a normalidade da distribuição.

O infiltrado inflamatório total e linfocitário foi expresso como média ± desvio padrão. A correlação entre o infiltrado inflamatório e o grau de tumor, tamanho e tipo histológico foi analisada utilizando o teste não paramétrico de correlação de Spearman. Para a análise qualitativa dos dados, foram utilizados dois intervalos de

intensidade de infiltrado inflamatório total e linfocitário baixa contagem (< 800 linfócitos) e alta contagem (> 800 linfócitos).

Foram utilizados métodos não paramétricos para descrição e teste das células CD79a+, dado que o número de amostras serem menor que 30 e não seguirem distribuição normal. Os dados numéricos quanto ao infiltrado das células CD79a+ foram descritos como média±desvio padrão. Os escores das células CD79a positivas foram expressos como porcentagem. As correlações de classificação de Spearman foram utilizadas para descrever as associações entre o resultado da imunoistoquímica e os fatores prognósticos analisados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney (quando dois grupos foram comparados) ou Kruskal-Wallis (mais de dois grupos).

O teste de qui-quadrado de Pearson foi utilizado para avaliar a associação entre as variáveis categóricas. A significância estatística foi considerada quando  $P < 0,05$  e as análises foram realizadas no software IBM SPSS22®.

### 3. Resultados e Discussão

Foram avaliadas 38 gatas, das quais 92,1% (35/38) eram sem raça definida, 5,3% (2/38) eram siameses e uma não teve a raça informada. O predomínio de gatas sem raça definida reflete a casuística maior de amostras provenientes de animais sem raça definida recebidos pelo SOVET-LRD/UFPEL. Felinos da raça siamesa tem maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasmas mamários (Zappulli et al., 2015; Saif et al., 2016), embora no Brasil a predisposição racial não tenha sido ainda observada (Cunha et al., 2017; Cassali et al., 2018). A idade variou de 6 a 21 anos, com idade média de 11,8 anos para o aparecimento de neoplasmas mamários. Esses tumores são mais frequentes em animais idosos (Togni, Masuda, Kommers, Figuera & Irigoyen, 2013; Cassali et al., 2018).

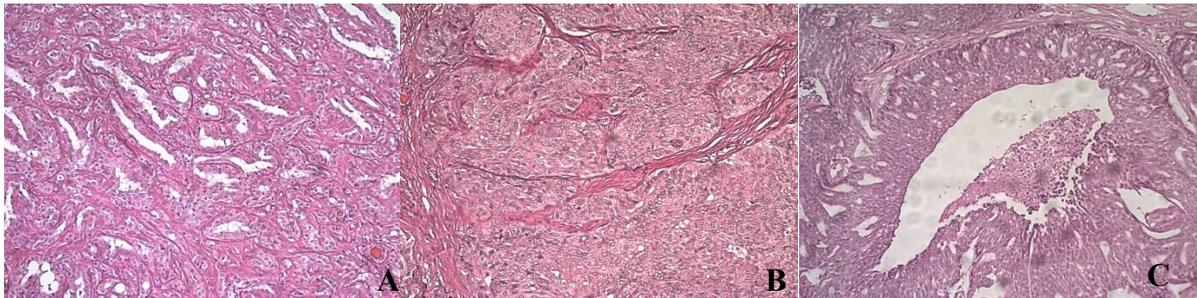
Da avaliação de amostras de 38 animais, resultaram 77 diagnósticos de neoplasmas mamários, devido ao fato que 55,3% (21/38) dos animais apresentaram mais de um nódulo. Este dado difere do encontrado por Borrego, Cartagena & Engel (2009) onde 87% dos neoplasmas encontrados em 23 gatas eram solitários. Dos animais com mais de um nódulo, 36,8% (14/38) apresentaram tumores múltiplos e 18,5% (7/38) tumores multifocais. Apenas 44,7% (17/38) dos animais apresentaram nódulos únicos. Destes, 97,4% (75/77) eram neoplasmas malignos.

Quanto aos tipos histológicos malignos os mais frequentes foram os carcinomas tubulares (37,3% [28/75]), os carcinomas sólidos (32% [24/75]), os carcinomas cribriformes (22,7% [17/75]), e os carcinomas papilares (4% [3/75]). O carcinoma lobular, o carcinoma de células escamosas e o adenomioepitelioma maligno foram os menos frequentes e representaram 1,3% (1/75) dos casos cada um. Sabe-se que os tipos histológicos encontrados podem ser diversificados, os carcinomas tubulares, papilares, sólidos, cribriformes e *in situ* são considerados diagnósticos comuns na glândula mamária de gatas (Campos et al., 2016; Cassali et al., 2018).

Para a avaliação do grau, tamanho e distribuição do infiltrado inflamatório, foram analisados 66 neoplasmas com diagnóstico de carcinomas tubulares, cribriformes e sólidos (Figura 1). Em relação ao grau, 59,1% (39/66) dos tumores malignos eram grau III, 31,8% (21/66) grau II e 7,6% (5/66) grau I, não sendo possível avaliar o grau de apenas um neoplasma. Neoplasmas mamários de grau II e III são frequentes em felinos (Borrego et al., 2009; Zappulli et al., 2015; De Campos et al., 2016; Seixas, Antunes, Pires, 2018). O grau histológico influencia significativamente o comportamento biológico dos tumores mamários felinos, principalmente os de grau III e seu efeito se sobrepõe a outros fatores, como idade, tamanho do tumor e tipo histológico (Seixas, Palmeira, Pires, Bento & Lopes, 2011). Portanto, fatores prognósticos adicionais são necessários para diferenciar o seu

comportamento biológico (Viste, Myers, Singh & Simko, 2002).

**Figura 1** – Tipos histológicos de carcinoma mamário de gatas (Hematoxilina-eosina) 40X. A) Carcinoma tubular composto por proliferação epitelial disposta de forma predominantemente tubular. B) Carcinoma sólido constituído por células epiteliais que formam cordões ou ninhos de células, sem formação de luz tubular. C) Carcinoma cribriforme composto por proliferação de células epiteliais neoplásicas formando um arranjo semelhante a uma peneira.

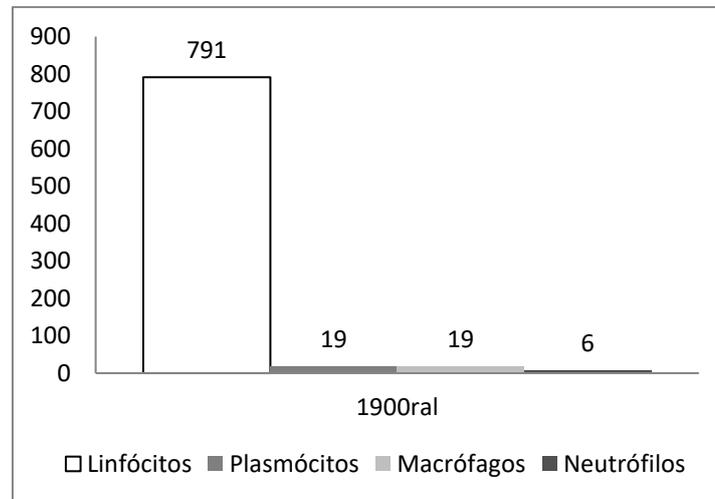


Fonte: autores.

Quanto o tamanho dos neoplasmas malignos, 51,5% (34/66) eram de tamanho T1; 16,7% (11/66) de tamanho T2 e 21,2% (14/66) de tamanho T3. Não foram informados os tamanhos de 10,6% (7/66) dos neoplasmas, pois se tratavam de fragmentos, sem informação do tamanho total. Neste estudo, a frequência de tumores de tamanho menor que 2 cm foi elevada, fato que poderia estar relacionado a um melhor prognóstico, já que o tamanho é um importante fator prognóstico na espécie felina (Viste et al., 2002; Zappulli et al., 2015). No entanto, neste estudo, verificamos que a maioria dos tumores T1 eram grau III.

A distribuição do infiltrado inflamatório total nos neoplasmas foi predominantemente multifocal em 84,8% (56/66) dos casos, tanto nas regiões peritumorais como intra-tumorais, não diferindo com o encontrado na literatura em humanos e caninos (Macchetti et al., 2006; Estrela-Lima et al., 2010; Salgado et al., 2015; Carvalho et al., 2016). Apenas 10,7% (7/66) apresentaram infiltrado inflamatório difuso e 4,5% (3/66) infiltrado inflamatório focal. Não houve diferenças significativas no padrão de distribuição entre as categorias tipo histológico, grau e tamanho. Não foi possível realizar a contagem de células inflamatórias em três neoplasmas por não atenderem os critérios de contagem.

A média de células inflamatórias totais nos 66 neoplasmas foi de  $835 \pm 654$ , com predomínio de linfócitos na quase totalidade dos neoplasmas onde a média foi de  $791 \pm 659$ . Plasmócitos e macrófagos foram encontrados em número reduzido na maioria dos neoplasmas em relação ao número de linfócitos (Figura 2). Em apenas um caso o infiltrado era predominantemente histiocítico e neutrofílico. Tem sido relatado que populações heterogêneas das células do sistema imune frequentemente se infiltram nos tumores mamários, cujos linfócitos são as principais células em neoplasmas mamários de caninos (Lopes-Neto et al., 2017; de Souza et al., 2018) não diferindo ao encontrado nas amostras de felinos.

**Figura 2** – Composição do infiltrado inflamatório nos carcinomas mamários felinos.

Fonte: Autores.

Neste estudo, a média das células inflamatórias totais e linfocitárias dos carcinomas tubulares, sólidos e cribriformes quanto aos parâmetros tipo histológico, grau e tamanho, invasão tecidual e linfática foi avaliada em 33 tumores (Tabela 1). Gatas com neoplasmas de mais de um tipo histológico diferente foi censurada, pois alguns dos tumores pertenciam a mesma mama ou a glândulas mamárias próximas, desta forma, poderia haver interferência no número e intensidade do infiltrado inflamatório.

**Tabela 1** – Quantificação das células inflamatórias totais e linfocitárias nos carcinomas mamários de gatas.

Parâmetros	N	Infiltrado total		Infiltrado linfocitário		
		Média	DP	Média	DP	
Grau histológico	Grau I	4	525,10	339,91	517,85	334,29
	Grau II	7	886,86	481,07	860,80	481,45
	Grau III	21	885,30	711,52	850,46	705,05
Tipo histológico	Carcinoma Tubular	13	649,40	323,09	625,65	324,35
	Carcinoma cribriforme	8	895,75	470,34	855,85	466,40
	Carcinoma Sólido	12	986,88	896,54	958,62	885,89
Tamanho	T1 (<2cm)	19	901,59	694,40	876,51	695,05
	T2 (2-3cm)	5	647,80	411,85	606,92	415,04
	T3 (>3 cm)	5	488,60	101,57	473,92	93,16
Invasão tecidual	Sim	23	874,02	597,41	848,69	598,92
	Não	9	755,27	739,29	715,2	711,94
Invasão linfática	Sim	13	895,45	847,92	861,48	837,97
	Não	19	803,11	448,57	776,71	445,97

Fonte: Autores.

Verificamos que a média das células inflamatórias totais e linfocitárias foi maior nos tumores T1 em relação aos tumores T3, assim como nos Carcinomas sólidos em relação aos tubulares e nos tumores grau III em relação ao grau I (Tabela 1). Em um estudo em caninos, foi demonstrado que houve uma associação entre o número

de células CD3 + e o grau do tumor, onde neoplasmas graus II e III apresentaram maior número de células CD3+ do que em outros tumores, além disso, os cães com um alto nível de infiltrado inflamatório nos tecidos tumorais apresentaram um tempo de sobrevida menor do que os outros cães (Franzoni et al., 2019).

Quanto a intensidade do infiltrado inflamatório dos 33 neoplasmas analisados (Tabela 2), verificamos que a maioria dos neoplasmas apresentaram infiltrado inflamatório total e linfocitário menor que 800 células (baixa contagem) independentemente do tipo tumoral, grau ou tamanho. Não havia informação de grau de um neoplasma, e de tamanho de 4 neoplasmas, por não atender aos critérios de classificação.

Neste estudo, 66,7% dos carcinomas mamários das gatas apresentou infiltrado linfocitário de baixa contagem, este dado se difere do encontrado em um estudo em cadelas, onde o infiltrado linfocitário intenso ( $\geq 800$ ) predominou nos carcinomas mamários de cadelas (Lopes-Neto et al., 2017).

**Tabela 2** – Avaliação da intensidade do infiltrado total e linfocitário dos carcinomas mamários de gatas.

Parâmetros	Infiltrado inflamatório			Infiltrado linfocitário			N	
	<800	>800	P	<800	>800	P		
Tipo Histológico	Carcinoma sólido	7(58,3%)	5(41,7%)	-	7(58,3%)	5(41,7%)	-	12
	Carcinoma tubular	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,571	10(76,9%)	3(23,1%)	0,319	13
	Carcinoma cribriforme	5 (62,5%)	3(37,5%)	0,852	5(62,5%)	3(37,5%)	0,852	8
		21(63,6%)	12(36,4%)		22(66,7%)	11(33,3%)		33
Grau histológico	Grau III	12(57,1%)	9(42,9%)	-	13(61,9%)	8(38,1%)	-	21
	Grau II	4(57,1%)	3(42,9%)	1,0	4(57,1%)	3(42,9%)	0,823	7
	Grau I	4(100%)	-	0,102	4(100%)	-	0,134	4
		20(62,5%)	12(37,5%)		21(65,6%)	11(34,4%)		32
Tamanho	T3: > 3 cm	5(100,0%)	-	-	5(100,0%)	-	-	5
	T2: 2 -3 cm	4(80%)	1(20%)	0,292	4(80%)	1(20%)	0,292	5
	T1: < 2 cm	10(52,6%)	9(47,4%)	0,052	11(57,9%)	8(42,1%)	0,076	19
		19(65,5%)	10(34,5%)		20 (69%)	9(31%)		29

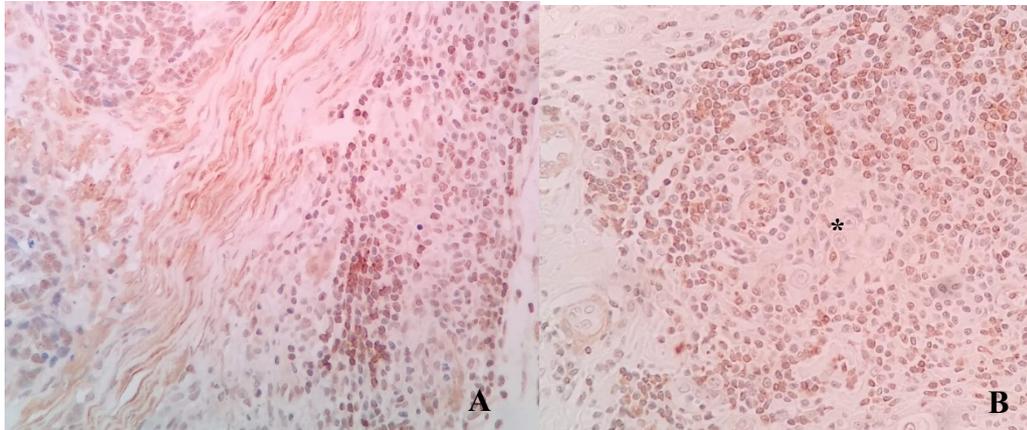
Fonte: Autores.

Um estudo conduzido por Dagher et al., (2019) em gatas demonstrou inflamação histiolinfocitária e plasmocítica moderada a grave em 51,4% dos neoplasmas mamários, além disso, embora a avaliação tenha sido qualitativa, Dagher et al., (2019) demonstrou uma piora na sobrevida nas gatas com infiltrado moderado a grave. Em caninos o infiltrado linfocitário intenso foi associado a maior agressividade em carcinomas mamários, uma vez que se observou maior infiltrado de linfócitos em tumores com alto grau histológico, invasão de vasos linfáticos e necrose (Kim et al., 2013). Sugere-se que em cães um maior número de linfócitos tumorais possa ser necessário para o comportamento maligno (Lopes-Neto et al., 2017).

Um estudo conduzido em felinos relacionou a presença de infiltrado inflamatório crônico a uma piora no prognóstico, pois o infiltrado inflamatório crônico foi associado à necrose em carcinomas mamários (Weijer & Hart, 1983). Porém, estudos adicionais que relacionam o infiltrado inflamatório e linfocitário com fatores prognósticos em felinos não são conhecidos.

Foram analisados 28 carcinomas mamários de felinos quanto a marcação de CD79a. Houve marcação positiva para CD79a em linfócitos e plasmócitos em 85,7% dos neoplasmas (Figura 3), não havendo marcação em apenas 14,3% dos casos analisados.

**Figura 3** – Fotomicrografia de imunistoquímica em carcinoma mamário de gata utilizando anticorpo anti-CD79a. A) Marcação de linfócitos B no infiltrado inflamatório peritumoral. B) Marcação de linfócitos B em áreas de invasão tumoral. Notar células epiteliais neoplasias invasivas (\*).



Fonte: Autores.

A maioria dos carcinomas apresentou áreas multifocais de infiltrado linfocitário, e as células CD79a+ eram encontradas distribuídas de forma difusa nos focos de infiltrado linfocitário, independentemente do tipo tumoral e grau histológico (Tabela 3), demonstrando que os linfócitos B e plasmócitos são componentes integrantes do infiltrado inflamatório tumoral. Esses dados são semelhantes aos encontrados em um estudo de tumor de mama humano, onde o padrão predominante foi o difuso (Mahmoud et al., 2012). Houve um maior número de agregados em carcinomas sólidos em relação aos carcinomas tubulares e cribriformes, assim como nos neoplasmas de grau II e III.

**Tabela 3** – Características dos carcinomas mamários quanto a densidade de marcação de CD79a.

Características		Categorias de linfócitos B + Plasmócitos			N	P
		Ausente	Difuso	Agregado		
Carcinoma tubular		3(27,3%)	7 (63,6%)	1(9,1%)	11	0,251
Carcinoma cribriforme		1(14,3%)	5 (71,4%)	1(14,3%)	7	
Carcinoma sólido		-	6 (60%)	4 (40%)	10	
Grau I		-	3(100%)	-	3	0,414
Grau II		1(14,4%)	3(42,8%)	3(42,8%)	7	
Grau III		3(16,7%)	12(66,6%)	3(16,7%)	18	
Invasão linfática	Sim	3 (25%)	9 (75%)	-	12	0,038*
	Não	1 (6,2%)	9 (56,3%)	6(37,5%)	16	
Invasão tecidual	Sim	2(10%)	14 (70%)	4(20%)	20	0,516
	Não	2(25%)	4(50%)	2(25%)	8	
Metástase linfonodo	Sim	-	4(57,1%)	3(42,9%)	7	0,257
	Não	-	2(100%)	-	2	
Tamanho	<2cm	1(6,2%)	10(62,5%)	5(31,3%)	16	0,137
	2-3cm	-	3(100%)	-	3	
	>3cm	2(40%)	3(60%)	-	5	

Fonte: Autores.

Na análise univariada, as categorias de imunomarcção (ausente, difuso e folicular/agregado) das células CD79a+ e os parâmetros histológicos avaliados (tipo histológico, grau, tamanho, invasão local, invasão linfovascular e metástase em linfonodo) revelaram diferença significativa para invasão linfática (P=0,038).

A média geral das células imunomarcadas nos carcinomas foi de  $50 \pm 70$ , estes resultados são semelhantes aos encontrado em cães. As células B consistem no segundo linfócito infiltrador de tumor mais abundante (Yuen et al., 2016). Os resultados das médias de contagem de células CD79a quanto aos parâmetros analisados estão apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4** – Quantificação de células CD79a quanto aos parâmetros histológicos analisados nos neoplasmas mamários malignos em felinos.

Parâmetros	CD79a		
	Média	N	P#
Carcinoma tubular (a)	39,50±62,88	11	(a-b) = 0,121
Carcinoma sólido (b)	76,54±92,98	10	(b-c) = 0,770
Carcinoma cribriforme (c)	28,58±17,10	7	(a-c) = 0,317
Grau I	65,23±68,62	3	(I-II) = 0,732
Grau II	69,36±91,95	7	(I-III) = 0,314
Grau III	39,93±61,97	18	(II-III) = 0,770
Tamanho <2cm (d)	56,68±67,16	16	(d-f) = 0,045*
Tamanho 2-3cm (e)	19,93±8,63	3	(d-e) = 0,5
Tamanho >3cm (f)	12,5±17,15	5	(e-f) = 0,29
Invasão linfática	Sim 22,05±26,88	12	0,039*
	Não 70,96±84,15	16	
Invasão tecidual	Sim 56,41±79,26	20	0,839
	Não 33,97±34,54	8	
Metástase linfonodo	Sim 59,16±91,05	7	0,079
	Não 10,95±3,74	2	

Fonte: Autores.

Houve diferença significativa quanto ao tamanho tumoral, onde o número de células CD79a+ foi significativamente maior em carcinomas menores que 2cm quando comparado aos tumores maiores que 3cm ( $P=0,045$ ) e houve correlação significativa entre tamanho e média de células CD79a positivas ( $P=0,045$ ). As médias de células CD79a+ foi significativamente maior nos neoplasmas sem invasão linfática em comparação aos com invasão ( $P=0,039$ ). Sugere-se que um maior número de células CD79 pode estar relacionado a um melhor prognóstico em gatas, pois os valores maiores de células CD79 foram maiores em tumores pequenos e sem invasão linfática. Sabe-se que a invasão linfática e o tamanho são importantes fatores prognósticos para neoplasmas mamários de gatas e cadelas (Cassali et al., 2018, 2020). Ainda, neste estudo os neoplasmas T1 tiveram média células CD79 proporcionalmente maior em relação a número de linfócitos, quando comparado com os neoplasmas T3.

O microambiente tumoral é um fator chave na determinação das propriedades do potencial invasivo e metastático do tumor e parece também ser heterogêneo (Tashireva et al., 2015; Lopes-Neto et al., 2017). Em humanos, o microambiente tumoral na maioria dos neoplasmas sólidos é infiltrado por células T, macrófagos, fibroblastos e células dendríticas (Tashireva et al., 2015). As células inflamatórias no microambiente tumoral podem estar envolvidas na promoção ou na supressão do crescimento neoplásico. A interação entre células tumorais e outras células presentes no microambiente tumoral pode ser decisivo para o crescimento e a metástase. Isso pode ser potencializado pelo infiltrado inflamatório no microambiente tumoral através do remodelamento de tecidos e liberação de proteases, citocinas e fatores de crescimento (Salgado et al., 2015; Carvalho et al., 2016). Na análise morfológica das amostras em coloração de rotina, verificou-se neste estudo que a maioria das células inflamatórias no microambiente tumoral dos carcinomas mamários das gatas eram linfócitos e células CD79a

positivas fazem parte destas células linfocitárias.

Neste estudo a presença de células B e plasmócitos (CD79a positivas) nos tumores sem invasão linfática pode corresponder a um possível efeito protetor, ou ainda, estas células podem estar presentes em maior número na fase inicial do desenvolvimento tumoral, uma vez que a média de células CD79 positivas e contagem de linfócitos na análise morfológica do infiltrado inflamatório tumoral foi maior nos tumores T1. Ainda, verificou-se que nos carcinomas de grau III a média de linfócitos foi maior em relação aos carcinomas de grau I, e inversamente, a média de células CD79 foi menor em tumores grau III em relação aos neoplasmas de grau I, portanto essas células podem estar associadas a tumores de menor malignidade como ocorre em cães, onde a presença de linfócitos B e plasmócitos estava associados a tumores mamários menos agressivos (de Souza et al., 2018).

#### 4. Considerações Finais

Através do presente estudo concluiu-se que as células linfocitárias representam uma parcela significativa infiltrado inflamatório tumoral, sendo a população celular predominante. Estas células podem ter um potencial fator prognóstico nos carcinomas mamários de gatas. Este é o primeiro estudo a quantificar as células inflamatórias do microambiente tumoral em carcinomas mamários de gatas, e revela resultados iniciais promissores. As células CD79a positivas compõem uma porção significativa da população linfocitária do microambiente tumoral e fazem parte da resposta inflamatória associada ao tumor nos carcinomas mamários felinos. Estas células foram encontradas de forma difusa de modo geral em todos os neoplasmas, e podem estar relacionados ao comportamento biológico tumoral como tamanho e invasão linfática. Este estudo fornece dados preliminares para a caracterização de possíveis marcadores imunológicos e prognósticos para carcinomas mamários de felinos e como tal pode ser explorada em estudos futuros.

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

#### Referências

- Borrego, J. F., Cartagena, J. C., & Engel, J. (2009). Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): A retrospective study of 23 cases (2002-2007). *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(4), 213–221. 10.1111/j.1476-5829.2009.00194.x.
- Campos, C. B., Damasceno, K. A., Gamba, C. O., Ribeiro, A. M., Machado, C. J., Lavalle, G. E., & Cassali, G. D. (2016). Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(12), 1003–1012. 10.1177/1098612X15610367.
- Carvalho, M. I., Pires, I., Prada, J., & Queiroga, F. L. (2011). T-lymphocytic infiltrate in canine mammary tumours: Clinic and prognostic implications. In *Vivo*, 25(6), 963–969.
- Carvalho, M. I., Silva-Carvalho, R., Pires, I., Prada, J., Bianchini, R., Jensen-Jarolim, E., & Queiroga, F. L. (2016). A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. *BioMed Research International*, 2016. 10.1155/2016/4917387.

- Cassali, G. D.; Campos, C. B. de; Bertagnolli, A. C., Lima, A. E., Lavallo, G. E., Damasceno, K. A., Nardi, A. B. de; Cogliati, B., Costa, F. V. A. da; Sobral, R., Di Santis, G. W., Fernandes, C. G., Ferreira, E., Salgado, B. S., Vieira Filho, C. H. C., Silva, D. N., Martins Filho, E. F., Teixeira, S. V., Nunes, F. C., & Nakagaki, K. Y. R. (2018). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 55(2), 1–17. 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2018.135084.
- Cassali, G. D., Jark, P., Gamba, C., Damasceno, K., Estrela-Lima, A., DE NARDI, A. B., Ferreira, E., Horta, R., Firmo, B., Sueiro, F., Rodrigues, L., & Nakagaki, K. (2020). Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 13(3), 555–574. 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574.
- Dagher, E., Abadie, J., Loussouarn, D., Campone, M., & Nguyen, F. (2019). Feline Invasive Mammary Carcinomas: Prognostic Value of Histological Grading. *Veterinary Pathology*, 56(5), 660–670. 10.1177/0300985819846870.
- De Souza, T. A., de Campos, C. B., De Biasi Bassani Gonçalves, A., Nunes, F. C., Monteiro, L. N., de Oliveira Vasconcelos, R., & Cassali, G. D. (2018). Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, 119(October 2017), 209–214. 10.1016/j.rvsc.2018.06.012.
- Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403–410. 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
- Estrela-Lima, A., Araújo, M. S. S., Costa-Neto, J. M., Teixeira-Carvalho, A., Barrouin-Melo, S. M., Cardoso, S. V., Martins-Filho, O. A., Serakides, R., & Cassali, G. D. (2010). Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. *BMC Cancer*, 10. 10.1186/1471-2407-10-256.
- Franzoni, M. S., Brandi, A., de Oliveira Matos Prado, J. K., Elias, F., Dalmolin, F., de Faria Lainetti, P., Prado, M. C. M., Leis-Filho, A. F., & Fonseca-Alves, C. E. (2019). Tumor-infiltrating CD4+ and CD8+ lymphocytes and macrophages are associated with prognostic factors in triple-negative canine mammary complex type carcinoma. *Research in Veterinary Science*, 126(May), 29–36. 10.1016/j.rvsc.2019.08.021.
- Goldschmidt, M. H., Peña, L., & Zappulli, V. (2017). Tumors of the Mammary Gland. In Meuten D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. (5th ed., pp. 723–765). John Wiley & Sons Inc.
- Kim, J. H., Yu, C. H., Yhee, J. Y., Im, K. S., & Sur, J. H. (2010). Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 142(2–3), 177–186. 10.1016/j.jcpa.2009.10.023.
- Kim, J. H., Chon, S. K., Im, K. S., Kim, N. H., & Sur, J. H. (2013). Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic and immunohistochemical morphometric study. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 77(2), 142–149.
- Knief, J., Reddemann, K., Petrova, E., Herhahn, T., Wellner, U., & Thorns, C. (2016). High density of tumor-infiltrating b-lymphocytes and plasma cells signifies prolonged overall survival in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Anticancer Research*, 36(10), 5339–5345. 10.21873/anticancer.11107.
- Lopes-Neto, B. E., Caroline, S., Souza, B., Bouty, L. M., Jonas, G., Santos, L., & Oliveira, E. S. (2017). CD4+, CD8+, FoxP3+ and HSP60+ Expressions in Cellular Infiltrate of Canine Mammary Carcinoma in Mixed Tumor. *Acta Scientiae Veterinariae*, 55(85), 1–8. 10.22456/1679-9216.80758.
- Macchetti, A. H., Marana, H. R. C., Silva, J. S., De Andrade, J. M., Ribeiro-Silva, A., & Bighetti, S. (2006). Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics*, 61(3), 203–208. 10.1590/S1807-59322006000300004.
- Mahmoud, S. M. A., Lee, A. H. S., Paish, E. C., MacMillan, R. D., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2012). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 132(2), 545–553. 10.1007/s10549-011-1620-1.

- O'Neill, K., Guth, A., Biller, B., Elmslie, R., & Dow, S. (2009). Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(4), 875–881. 10.1111/j.1939-1676.2009.03333.x.
- Pérez, J., Day, M. J., Martín, M. P., Gonzalez, S., & Mozos, E. (1999). Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1;69(1):33-46. 10.1016/s0165-2427(99)00032-x.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., ... Loi, S. (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Annals of Oncology*, 26(2), 259–271. 10.1093/annonc/mdl450.
- Seixas, F., Antunes, D., & Pires, M. A. (2018). Immunohistochemical Analysis of T Lymphocytes (CD3 +) in Feline Mammary Lesions. *Journal of Comparative Pathology*, 158, 126. 10.1016/j.jcpa.2017.10.096.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., Bento, M. J., & Lopes, C. (2011). Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: A clinicopathological and survival analysis. *Veterinary Journal*, 187(1), 65–71. 10.1016/j.tvjl.2009.10.030.
- Shen, M., Wang, J., & Ren, X. (2018). New insights into tumor-infiltrating B lymphocytes in breast cancer: Clinical impacts and regulatory mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1–8. 10.3389/fimmu.2018.00470.
- Tashireva, L., Denisov, E., Savelieva, O., Zavyalova, M., Kaigorodova, E., Slonimskaya, E., & Perelmuter, V. (2015). A14: Heterogeneity in breast tumor microenvironment: A report from one case. *European Journal of Cancer Supplements*, 13(1), 61. 10.1016/j.ejcsup.2015.08.109.
- Togni, M., Masuda, E. K., Kommers, G. D., Figuera, R. A., & Irigoyen, L. F. (2013). Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(3), 353–358. 10.1590/S0100-736X2013000300013.
- Viste, J. R., Myers, S. L., Singh, B., & Simko, E. (2002). Feline mammary adenocarcinoma: Tumor size as a prognostic indicator. *Canadian Veterinary Journal*, 43(1), 33–37. 10.1111/j.1751-0813.2002.tb11342.x.
- Weijer, K., & Hart, A. A. M. (1983). Prognostic Factors in Feline Mammary Carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 70(4). 10.1093/jnci/70.4.709.
- Wouters, M. C. A., & Nelson, B. H. (2018). Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(24), 6125–6135. 10.1158/1078-0432.CCR-18-1481.
- Yuen, G. J., Demissie, E., & Pillai, S. (2016). B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trends in Cancer*, 2(12), 747–757. 10.1016/j.trecan.2016.10.010.
- Zappulli, V., Rasotto, R., Caliarì, D., Mainenti, M., Peña, L., Goldschmidt, M. H., & Kiupel, M. (2015). Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. *Veterinary Pathology*, 52(1), 46–60. 10.1177/0300985814528221.

### 3 Considerações Finais

Os neoplasmas mamários de felinos ainda representam um desafio para o diagnóstico devido ao seu comportamento agressivo, e novos parâmetros prognósticos precisam ser estudados para estas neoplasias. Neste contexto, buscou-se realizar o levantamento das gatas acometidas por neoplasmas mamários quanto a sua distribuição e morfologia e analisar o perfil do infiltrado inflamatório nos carcinomas mamários de felinos.

Pode-se traçar o perfil do infiltrado inflamatório dos carcinomas mamários, verificamos que todos os neoplasmas estudados apresentaram infiltrado inflamatório, em sua maioria distribuídos de forma multifocal nas regiões peritumorais. Os linfócitos constituíram a população predominante, e pode ser um potencial fator prognóstico nos carcinomas mamários de gatas. Em cães e humanos, um maior número de linfócitos está relacionado a um maior tempo de sobrevida.

A análise imunohistoquímica demonstrou que as células CD79a positivas são a segunda população mais frequente nos neoplasmas felinos. Estas células se distribuíam de modo difuso na maioria dos neoplasmas, formando poucos agregados. Além disso, foram encontrados em maior número nos neoplasmas menores que 2,0cm e sem invasão linfática. Portanto, as células Cd79a podem estar relacionadas a critérios de malignidade.

## Referências

BORREGO J.F., CARTAGENA J.C. & ENGEL J. Treatment of feline mammary tumours using chemotherapy, surgery and a COX-2 inhibitor drug (meloxicam): a retrospective study of 23 cases (2002–2007). **Veterinary and Comparative Oncology**. v.7, n. 4, p. 213-222, 2009.

CAMPOS C.B., DAMASCENO K.A., GAMBA C.O., RIBEIRO A.M., MACHADO C.J., LAVALLE G.E. & CASSALI G.D. Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 18, n. 12, p. 1003-1012, 2016.

CARVALHO M.I., PIRES I., PRADA J. & QUEIROGA, F.L. T-Lymphocytic Infiltrate in Canine Mammary Tumours: Clinic and Prognostic Implications. **In vivo**. v. 25, no. 6, p. 963–969, 2011.

CARVALHO M.I., PIRES I., PRADA J., QUEIROGA F.L. A Role for T-Lymphocytes in Human Breast Cancer and in Canine Mammary Tumors,” **BioMed Research International**, v. 2014:130894, 11 p., 2014.

CARVALHO, M.I., SILVA-CARVALHO, R., PIRES, I., PRADA, J., BIANCHINI, R., JENSEN-JAROLIM, E., & QUEIROGA, F.L. A Comparative Approach of Tumor-Associated Inflammation in Mammary Cancer between Humans and Dogs. **BioMed Research International**, v. 2016:4917387, 12 p., 2016.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 153–180, 2011.

CASSALI, G., CAMPOS, C., BERTAGNOLLI, A., ESTRELA-LIMA, A., LAVALLE, G. E., DAMASCENO, K., DI NARDI, A., COGLIATI, B., COSTA, F., SOBRAL, R., DI SANTIS, G., FERNANDES, C., FERREIRA, E., SALGADO, B., VIEIRA-FILHO, C. H., SILVA, D., MARTINS-FILHO, E., TEIXEIRA, S., NUNES, F., & NAKAGAKI, K. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1-17, e135084, 2018.

CASSALI, G. D., JARK, P., GAMBA, C., DAMASCENO, K., ESTRELA-LIMA, A., DE NARDI, A. B., FERREIRA, E., HORTA, R., FIRMO, B., SUEIRO, F., RODRIGUES, L., & NAKAGAKI, K. Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, 13(3), 555–574, 2020.

CONDEELIS J. & POLLARD J.W. Macrophages: obligate partners for tumour cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**. v.124, n. 2, p.263–266, 2006.

CUNHA S., CORGOZINHO K., JUSTEN H., SILVA K., LEITE J. & FERREIRA A. M. Survival and disease-free interval of cats with mammary carcinoma treated with chain mastectomy. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 44, n. 1, p. 1349, 2016.

CUNHA, S. C. S.; CORGOZINHO, K. B.; DE SOUZA, H. J. M.; DA SILVA, K. V. G. C.; LEITE, J. da S.; DE MELLO, M. F. V.; FERREIRA, A. M. R. Retrospective study on survival time of cats with mammary carcinomas undergoing surgery alone or with adjuvant chemotherapy. **World's Veterinary Journal**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 30–35, 2017.

DAGHER, E., ABADIE, J., LOUSSOUARN, D., CAMPONE, M., & NGUYEN, F. Feline Invasive Mammary Carcinomas: Prognostic Value of Histological Grading. **Veterinary Pathology**, 56(5), 660–670, 2019.

DE SOUZA, T. A., DE CAMPOS, C. B., DE BIASI BASSANI GONÇALVES, A., NUNES, F. C., MONTEIRO, L. N., DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R., & CASSALI, G. D. Relationship between the inflammatory tumor microenvironment and different histologic types of canine mammary tumors. **Research in Veterinary Science**, 119(October 2017), 209–214, 2018.

ELSTON C.W. & ELLIS I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**. v.19, n.5, p.403-410. 1991.

ESTRELA-LIMA A., ARAÚJO M.S.S., COSTA-NETO J.M., TEIXEIRA-CARVALHO A., BARROUIN-MELO S.M., CARDOSO S.V., MARTINS-FILHO O.A., SERAKIDES R. & CASSALI G.D. 2010. Immunophenotypic features of tumor infiltrating

lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**. v.10, n.256, p.3-14.

GOLDSCHMIDT M.H., PEÑA L. & ZAPPULLI V. Tumors of the Mammary Gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. 5.ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., pp.723-765. Meuten. 2017.

HELLMÉN, E.; MOLLER, M.; BLANKENSTEIN, M. A.; ANDERSSON, L.; WESTERMARK, B. Expression of different phenotypes in cell lines from canine mammary spindle-cell tumours and osteosarcomas indicating a pluripotent mammary stem cell origin. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 197–210, 2000.

KIM J.H., CHON S.K., IM K.S., KIM N.H. & SUR J.H. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes to histopathological features and molecular phenotypes in canine mammary carcinoma: A morphologic and immunohistochemical morphometric study. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.77, p.42-149. 2013.

KIM J.H., YU C.H.; YHEE J.Y., IM K.S. & SUR J.H. Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. **Journal of comparative pathology**. v.142, n.2-3, p.177-86. 2010.

KNIEF J., REDDEMANN K., PETROVA E., HERHAHN T., WELLNER U. & THORNS C. High Density of Tumor-infiltrating B-Lymphocytes and Plasma Cells Signifies Prolonged Overall Survival in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. **Anticancer Research**. v.36, n.10, p.5339-5345. 2016.

LOPES-NETO B.E., SOUZA S.C.B., BOUTY L.M., SANTOS G.J.L., OLIVEIRA E.S., FREITAS J.C.C. & NUNES-PINHEIRO D.C.S. CD4+, CD8+, FoxP3+ and HSP60+ Expressions in Cellular Infiltrate of Canine Mammary Carcinoma in Mixed Tumor. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.45, n.1, p.1-8. 2017.

MACCHETTI A.H., MARANA H.R.C., SILVA J.S., ANDRADE J.M., RIBEIRO-SILVA A. & BIGHETTI S. Tumor-infiltration CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. **Clinic**. v.61, n.3, p.203-208. 2006.

MAHMOUD S.M., LEE A.H., PAISH E.C., MACMILLAN R.D., ELLIS I.O. & GREEN A.R. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research and Treatment**. v.132, n.2, p. 545-53, 2012.

MENDES, T. C.; GUIM, T. N.; DIAS, M. F.; BONEL-RAPOSO, J.; FERNANDES, C. G. Comparação entre os sistemas histomorfológico e de graduação histológica para classificação prognóstica de tumores mamários em cadelas. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 339, 2007.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. MIB-1 Labeling Index in Feline Dysplastic and Neoplastic Mammary Lesions and Its Relationship with Postsurgical Prognosis. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 120–126, 2002.

MILLS, S. W.; Musil, K. M.; Davies, J. L.; Hendrick, S.; Duncan, C.; Jackson, M. L.; Kidney, B.; Philibert, H.; Wobeser, B.K.; Simko, E. Prognostic Value of Histologic Grading for Feline Mammary Carcinoma: A Retrospective Survival Analysis. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 238–249, 2015.

MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: **Tumors in domestic animals**. 4th ed. DJ Iowa State Press, Iowa, USA. pp.575-606, Meuten. 2002.

MORRIS, J. Mammary Tumours in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 391–400, 2013.

O'NEILL K., GUTH A., BILLER B., ELMSLIE R. & DOW S. Changes in Regulatory T Cells in Dogs with Cancer and Associations with Tumor Type. **Journal of Veterinary Intern.** v.23, n.4, p.875–881. 2009.

OVERLEY, B., SHOFER, F. S., GOLDSCHMIDT, M. H., SHERER, D. & SORENMO, K. U. Association between Ovarihysterectomy and Feline Mammary Carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, n.4, p.560–563, 2005.

PÉREZ J., DAY M.J., MARTÍN M.P., GONZÁLEZ S. & MOZOS E. Immunohistochemical study of the inflammatory infiltrate associated with feline cutaneous squamous cell carcinomas and precancerous lesions (actinic keratosis). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.69, n.1, p.33-46. 1999.

RAPOSO T., GREGÓRIO H., PIRES I., PRADA J., QUEIROGA F.L. Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.12, n.1, p.10–19. 2014.

SALGADO, R. ; DENKERT, C. ; DEMARIA, S. ; SIRTAINÉ, N. ; KLAUSCHEN, F. ; PRUNERI, G. ; WIENERT, S. ; VAN DEN EYNDEN, G. ; BAEHNER, F. L. ; PENAULT-LLORCA, F. ; PEREZ, E. A. ; THOMPSON, E. A. ; SYMMANS, W. F. ; RICHARDSON, ANDREA ; BROCK, J. ; CRISCITIELLO, C. ; BAILEY, H. ; IGNATIADIS, M. ; FLORIS, G. ; SPARANO, J. ; KOS, Z. ; NIELSEN, T. ; RIMM, D. L. ; ALLISON, K. H. ; REIS-FILHO, J. S. ; LOIBL, S. ; SOTIRIOU, C. ; VIALE, G. ; BADVE, S. ; ADAMS, S. ; WILLARD-GALLO, K. ; LOI, SHERENE. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. In: **Annals of oncology**. v. 26, n. 2, p. 259-271. 2015.

SARLI G., PREZIOSI R., BENAZZI C., BAZZO R., MANDRIOLI L. & MARCATO P.S. Rate of apoptosis in feline mammary tumors is not predictive of postsurgical survival. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.15, p.115–122. 2003.

SEIXAS F., PALMEIRA C., PIRES M.A. & LOPES C. Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. **Research in Veterinary Science**. v.84, n.3, p.428–433. 2008.

SEIXAS F., PALMEIRA C., PIRES M.A., BENTO M.J., LOPES C. Grade is an independent prognostic factor for feline mammary carcinomas: a clinicopathological and survival analysis. **The Veterinary Journal**. Jan, v.187, n.1, p.65-71. 2011.

SHEN M., WANG J. & REN X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. **Frontiers in Immunology**. v.8, n.9, 470, 2018.

SPADER, M. B. ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E FATORES PROGNÓSTICOS PELA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs EM TUMORES MAMÁRIOS FELINOS. 2009 p. 58, Dissertação de Mestrado em Patologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2009.

TASHIREVA, L., DENISOV, E., SAVELIEVA, O., ZAVYALOVA, M., KAIGORODOVA, E., SLONIMSKAYA, E., & PERELMUTER, V. A14: Heterogeneity in breast tumor microenvironment: A report from one case. **European Journal of Cancer Supplements**, 13(1), 61, 2015.

STANTON S.E., DISIS M.L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**. Oct 18; 4:59, 2016.

TOGNI M., MASUDA E.K., KOMMERS G.D.; FIGHERA R.A. & IRIGOYEN L.F. Estudo retrospectivo de 207 casos de tumores mamários em gatas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.3, p.353-358, 2013.

VISTE J.R., MYERS S.L., SINGH B. & SIMKO E. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. **The Canadian veterinary journal**, v.43, n.1, p.33–37, 2002.

WEIJYER, K. & HART, A.A.M., Prognostic factors in feline mammary carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**. v.70, p.709-716, 1983.

WINSTON J., CRAFT D.M., SCASE T.J. & BERGMAN P.J. Immunohistochemical detection of HER-2/neu expression in spontaneous feline mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.3, n.1, p.8–15, 2005.

WOUTERS M.C.A. & NELSON B.H. Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancer. *Clinical Cancer Research*. 24:6125–6135. Yuen, G. J., Demissie, E., & Pillai, S. 2016. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. **Trends in cancer**, v.2, n.12, p.747–757, 2018.

YUEN, G. J., DEMISSIE, E., & PILLAI, S. B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. **Trends in Cancer**, 2(12), 747–757, 2016.

ZAPPULLI V., DE ZAN G., CARDAZZO B., BARGELLONI L., CASTAGNARO M. Feline mammary tumours in comparative oncology. **Journal of Dairy Research**. v.72, n. S1, p.98-106, 2005.

ZAPPULLI, V.; CALIARI, D.; RASOTTO, R.; FERRO, S.; CASTAGNARO, M.; GOLDSCHMIDT, M. Proposed Classification of the Feline “Complex” Mammary

Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1070–1077, 2013.

ZAPPULLI V., RASOTTO R., CALIARI D., MAINENTI M., PEÑA L., GOLDSCHMIDT M.H. & KIUPEL M. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas a review of the literature. **Veterinary Pathology**. v.52, n.1, p.46–60. 2015.

## **Anexos**

## **Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal**



Pelotas, 28 de novembro de 2016

### Certificado

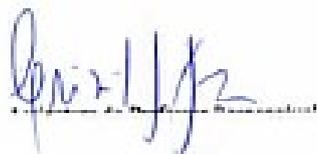
Certificamos que a proposta de ensino/extensão intitulada "Serviço de Oncologia Veterinária", registrada com o nº23110.007003/2016-06, sob a responsabilidade de Cristina Gevehr Fernandes - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 21/11/2016.

Finalidade	( ) Pesquisa (X) Ensino
Vigência da autorização	30/11/2016 a 31/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Cães, gatos, equinos
Nº de animais	1300 cães, 750 gatos, 30 equinos (biópsias e/ou cadáveres)
Idade	Variada
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Hospital de Clínicas Veterinárias - UFPel

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7003-2016).

  
M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix  
Presidente da CEEA



Ciente em: 28/11/2016