

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNODETECÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM  
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

**Geórgia Modé Magalhães**

Mestre em Medicina Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IMUNODETECÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM  
NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS.**

Geórgia Modé Magalhães  
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Junho de 2012

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**GEÓRGIA MODÉ MAGALHÃES** - nascida no dia 27 de março de 1982, natural de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. Iniciou sua graduação, no curso de Medicina Veterinária na Universidade de Franca, no ano de 2000. Em 2002 foi aprovada na prova de transferência para a FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, tendo concluído a graduação nesta instituição em janeiro de 2006. Desenvolveu projeto de iniciação científica, com bolsa CNPQ/PIBIC, sob a orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara e co-orientação do Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó. Durante a graduação, participou de vários cursos e estágios todos relacionados com a área de Anatomia Patológica. Ainda no último ano da graduação (2005) estagiou na Universidade de Louisiana (USA), onde acompanhou necropsias de animais domésticos e participou das aulas de Patologia Veterinária. No período de 2006 a 2008 foi residente do Programa de Aprimoramento Profissional da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi. Neste período, publicou vários resumos científicos em anais de congressos e em periódico internacional, além de participar de projeto de pesquisa científica. Em março de 2008 foi aprovada em primeiro lugar no Programa de Pós-Graduação (Mestrado), nessa mesma instituição, também sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi. Palestras e aulas foram ministradas neste período (SECITAP, aulas teóricas e práticas em cursos de pós-graduação *latu sensu*, Instituto BIOETHICUS em Botucatu, aulas para disciplinas de pós-graduação no Programa de Medicina Veterinária- UNESP Jaboticabal). Durante este período também realizou treinamento no setor de Oncologia do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, desta instituição de ensino, direcionado ao atendimento de cadelas com tumores de mama, sob a orientação da Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Recebeu menção honrosa durante a participação do Oncovet (2008) em um de seus trabalhos, com posterior publicação no Periódico internacional *Veterinary and Comparative Oncology*. Recebeu o título de melhor relato de caso no curso de Oncologia da UNESP de Botucatu (2008) e ainda neste ano ganhou terceiro lugar no concurso de redação científica no prêmio Walthan da Pedigree (2008-2009), na condição de orientadora de uma graduanda do Curso de Medicina Veterinária. Iniciou a participação no Boletim da

ABPV (Associação Brasileira de Patologia Veterinária) como editora e atualmente é uma das Editoras Seniors. Foi aprovada no curso de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação, FCAV-UNESP em primeiro lugar em março de 2010. Em Janeiro de 2010 foi aprovada em um concurso para Professor Substituto na Faculdade Federal de Uberlândia na área de Patologia Veterinária com duração de um ano. No mesmo ano de 2010 iniciou a docência na disciplina de Patologia Especial Veterinária na instituição privada (Fundação Francisco Maeda-FAFRAM) de Ituverava até os dias atuais. No ano de 2011 concluiu todos os créditos do doutorado, publicou dois trabalhos científicos relacionados ao mestrado. Continua participando de bancas de conclusões de cursos e aprimoramentos em Medicina Veterinária e ministrando palestras em disciplinas de graduação e pós-graduação. Em 2012 ministra também a disciplina de Ética Profissional e assumiu a presidência do Comitê de Ética da FAFRAM. É membro suplente do conselho fiscal da ABPV.

## **Dedicatória**

**Dedico este trabalho a minha família, sempre presente: meus pais, minhas duas irmãs maravilhosas e meu amor Paulo Martinelli.**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter colocado pessoas tão especiais no meu dia a dia que me ajudaram a fazer esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi pela orientação, conselhos, amizade, e por ser extremamente prestativo e atencioso.

À Profa. Dra. Rosemeri Vasconcelos de Oliveira por toda a amizade, paciência, sabedoria e dedicação com a Patologia. Obrigada pelas estatísticas e todas as dicas para melhorar o trabalho. Você é muito querida por todos nós.

Agradeço às amigas que também trabalham com tumor de mama Érika, Talita e Mayara, sempre dispostas a ajudar e muito dedicadas.

À Profa. Mirela e Profa. Renee pelas ajudas nas coletas e organizações do grupo de pesquisa em neoplasias mamárias caninas.

Aos colegas de laboratório Márcio e Pâmela pelas imensas ajudas nas imunohistoquímicas, conselhos e amizade.

À técnica Francisca de Assis Ardisson por toda paciência e eficiência na confecção das lâminas em cortes parafinados.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Alessi, Profa. Mirela, Profa. Rosemeri, Prof. Andrigo e Profa. Sabryna que colaboraram muito com o trabalho em tão pouco tempo.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de doutorado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram e contribuíram com esse trabalho.

**SUMÁRIO**

	Página
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I Introdução.....	1
II Revisão de literatura.....	2
II-1 Neoplasias mamárias caninas.....	2
II-2 Células-tronco tumorais .....	4
III Objetivos.....	11
IV Materiais e Métodos.....	12
IV-1 Grupos Experimentais.....	12
IV-2 Imuno-histoquímica.....	13
IV-3 Contagem das células marcadas.....	15
IV-4 Análise estatística.....	15
V Resultados.....	16
VI Discussão.....	36
VII Conclusões.....	42
VIII Referências.....	43
IX Anexo A	54
X Anexo B	55

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1:</b> Número de amostras de neoplasias mamárias caninas divididas em tipo e grau histológico.	12
<b>Tabela 2:</b> Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em tecidos de neoplasias mamárias, cortes parafinizados.	13
<b>Tabela 3:</b> Identificação das neoplasias mamárias caninas expressando o fenótipo CD44+/CD24-	29
<b>Tabela 4:</b> Resultado do tipo e grau histológico dos tumores metastáticos	35
<b>Tabela 5:</b> Imunomarcação em células epiteliais e mesenquimais neoplásicas de carcinossarcomas mamários caninos.	36



**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1	17
Figuras 2 e 3	18
Figuras 4 e 5	19
Figuras 6 e 7	20
Figuras 8 e 9	21
Figuras 10 e 11	22
Figuras 12 e 13	23
Figuras 14 e 15	24
Figuras 16 e 17	25
Figura 18	26
Figura 19	27
Figura 20	29
Figura 21	30
Figura 22	31
Figura 23	32
Figura 24	33
Figura 25	35

## LISTA DE ABREVIATURAS

CD44 – (Cluster of differentiation) Molécula de adesão que pertence à família de glicoproteínas transmembranas.

ALDH - Aldeído desidrogenase.

Oct-4 - ligações de proteínas octâmero “Octamer”

CD24 - (Cluster of differentiation) antígeno termoestável

CTT - Célula-tronco tumoral

DAB – Diaminobenzidina

WHO - World Health Organization

OMS - Organização Mundial de Saúde

TEM - Transição epitélio mesênquima

## **RESUMO - IMUNODETECÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS**

Neoplasias mamárias caninas são muito frequentes em cadelas e há uma alta incidência de tumores malignos. Estudos recentes sobre carcinogênese propõem a detecção de células-tronco tumorais (CTTs) em neoplasias mamárias. A CTT é uma célula capaz de se auto-renovar e se diferenciar em células maduras no tecido a qual está inserida. Estudos em cães demonstraram marcações de CTTs por citometria de fluxo em culturas de neoplasias mamárias. Nesse estudo objetiva-se detectar as CTTs por meio de reações imuno-histoquímicas e relacioná-las com graus e tipos histológicos de neoplasias mamárias caninas. Com isso uma amostra de 136 neoplasias mamárias classificadas de acordo com Cassali et al. (2011) foi selecionada para o estudo utilizando os anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1. Avaliando as 130 amostras (exceto grupo dos carcinossarcomas), 40 apresentaram o fenótipo CD44+/CD24-, sendo a maioria em graus mais avançados e nas metástases. Os tumores de grau III normalmente exibiram mais células marcadas para CD44 do que para CD24. Para o marcador Oct-4 foi observado aumento significativo de células marcadas nos carcinomas sólidos, do grau II para o grau III. A marcação para o ALDH-1 quando positiva, associou-se com as neoplasias de maior grau de malignidade (II e III). Nos carcinossarcomas não houve diferença significativa entre a marcação dos componentes epiteliais e mesenquimais para os marcadores estudados. No grupo dos adenomas foram observadas poucas células marcadas para CD44 com aumento significativo de células marcadas para os anticorpos CD24 e Oct-4. Nesse grupo não foram observadas marcações para o ALDH-1. O inverso ocorreu nas células metastáticas, sendo a marcação significativamente maior para o anticorpo CD44 e pouco ou ausente nos demais. Em estudos realizados em cães por citometria de fluxo foram encontradas porcentagens de marcações para o fenótipo CD44/CD24 semelhantes aos encontrados nesse trabalho. As marcações para o anticorpo Oct-4 nos carcinomas sólidos condiz com a literatura humana, estando relacionada com o pior prognóstico. A marcação do ALDH-1 ocorreu em poucas células dentro da neoplasia provavelmente por ser uma pequena população de células que representem as CTTs. Concluindo que a imuno-

histoquímica é uma boa técnica para detecção de CTT em neoplasias caninas. E a presença dessas CTTs está relacionada com um pior prognóstico.

**Palavras chave:** célula-tronco tumoral, CD44, CD24, neoplasia canina.

**ABSTRACT - IMMUNODETECTION OF THE CANCER STEM CELL IN CANINE**

**MAMMARY NEOPLASMS-** Canine mammary neoplasias are very common in dogs and most of them are considered malignant. Strategies to new ways to treat these cancers have been proposed as the detection of cancer stem cells (CSC). A CSC is a cell able to self-renew and have abilities to form metastases. In canine mammary tumors these CSCs were isolated by flow cytometry by means of the surface markers CD44+/CD24-. The aims of this study was detect these CSCs by immunohistochemical reactions and relate them with grades and histological types of canine mammary neoplasias. Thus a sample of 136 breast neoplasias classified according by Cassali et al. (2011) were selected and performed immunohistochemical study for antibodies CD44, CD24, Oct-4 and ALDH-1. From 130 samples, 40 showed the phenotype CD44+/CD24-, mostly in the metastases. Grades III normally exhibited more CD44 than CD24. For the marker Oct-4 was significantly increased only in solid carcinomas. The ALDH-1 when present, is associated with a worse prognosis. In carcinosarcomas no significant difference between epithelial and mesenchymal components for markers of CSCs. Benign tumors scored low CD44, high to CD24 and Oct-4 and failed to score ALDH-1. In studies in dogs by flow cytometry were found percentages of CSCs markings similar to those found in this work. Concluding the immunohistochemistry is a good technique for detection CSCs in canine neoplasias.

**Key Words:** cancer stem cells, CD44, Cd24, canine neoplasia.

## I. INTRODUÇÃO

Tumores de mama são os mais frequentes em cadelas e estima-se que no Brasil a incidência de tumores malignos varia entre 68,4% (De NARDI et al., 2002) e 73,4% (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010). Nos Estados Unidos da América a incidência de tumores malignos é cerca de 50% (MISDORP, 1999). A neoplasia mamária canina é uma doença clinicamente muito importante na medicina veterinária, uma vez que sua incidência nesta espécie é 2 a 3 vezes superior à observada nas mulheres (BRODEY et al., 1983; SORENMO, 2003).

Apesar dos enormes progressos, a oncogênese do câncer de mama continua a ser um processo de vários passos ligado a mais de uma alteração molecular (WIDAKOWICH et al., 2007). Estudos recentes sobre carcinogênese propõem a detecção de células-tronco tumorais (CTT) em neoplasias mamárias (MICHISHITA et al., 2011; PANG & ARGYLE, 2010).

Uma CTT é uma célula capaz de se auto-renovar, ter habilidades para formar metástase e está associada com a resistência a quimioterápicos. Em neoplasias mamárias caninas essas CTTs já foram isoladas por citometria de fluxo através dos marcadores de superfície CD44+/CD24- (COCOLA et al., 2009).

Neste estudo, procurou-se detectar a presença de CTT por meio da técnica de imuno-histoquímica em neoplasias mamárias caninas e associá-las com os tipos e grau histopatológico. O conhecimento dessas células pode fornecer elementos que levem à melhor compreensão da carcinogênese mamária e com isso seja possível aperfeiçoar o prognóstico e o tratamento desses tumores. Ao mesmo tempo, estes resultados podem ser utilizados em estudos de oncologia comparada. Mais importante ainda seria a contribuição desses resultados para a oncologia veterinária, já que existem poucos estudos com CTT em tumores mamários na cadela.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### II. 1- Neoplasias mamárias caninas

Os tumores mamários caninos são úteis como modelo experimental para a espécie humana (SCHENEIDER et al., 1970; MOTTOLESE et al., 1994; SCHAFER et al., 1998; GAMA et al., 2008; UVA et al., 2009), sendo o diagnóstico inicial de uma neoplasia mamária em cadelas baseado na idade, histórico reprodutivo e sinais clínicos, incluindo a presença de edema mamário e aumento de linfonodos regionais (CASSALI et al., 2007). Para se atribuir um diagnóstico e estimar um prognóstico de uma cadela com tumor mamário, é necessária a remoção cirúrgica do mesmo (CHANG et al., 2005), seguindo-se a caracterização do tipo histológico, do grau de malignidade, o estadiamento clínico, a determinação do tamanho do tumor, a existência de metástase em linfonodos regionais e a presença de metástases distantes. Também devem ser avaliados fatores que interfiram na proliferação celular, apoptose e desregulação da diferenciação celular (BENJAMIN et al., 1999; PHILIBERT et al., 2003; CHANG et al., 2005; LAS MULAS et al., 2005; KUMARAGURUPARAN et al., 2006). Segundo Lester (2005), os fatores prognósticos são os mais fortes preditores de óbitos por câncer de mama em mulheres e são incorporados ao sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

Cadelas com neoplasias mamárias malignas possuem uma sobrevida significativamente curta quando comparadas àquelas com neoplasias benignas. A sobrevida global em dois anos foi relatada por estar entre 25% e 40%. No entanto, esta sobrevida pode ser influenciada por vários fatores e pode variar significativamente dependendo do tipo histológico e do grau de diferenciação, do estágio da doença e do tratamento empregado. Cadelas com neoplasias pequenas e bem diferenciadas possuem um prognóstico excelente após ressecção cirúrgica, já as cadelas com neoplasias mais malignas possuem um prognóstico mais reservado e podem necessitar de terapia adjuvante (SORENMO, 2003).

Karayannopoulou et al. (2005) observaram uma correlação dos tipos histológicos com o grau de malignidade de tumores de mama no cão. Os carcinomas complexos foram relacionados com o grau I, enquanto os carcinomas simples (os tipos mais malignos) foram relacionados com os graus II e III. Nas classificações histológicas autores consideram a presença de invasão sendo mais importante que o tipo histológico (MOULTON, 1990).

Nos tumores mamários caninos há muita discordância entre os diagnósticos, com muitas classificações morfológicas sendo propostas (BENJAMIN et al., 1999). Provavelmente as mais usadas são Moulton (MOULTON, 1990) e OMS, Organização Mundial de Saúde, "WHO", World Health Organization (HAMPE & MISDORP, 1974; MISDORP et al., 1999), as quais apresentam algumas divergências entre si. Uma dessas divergências está na classificação do carcinoma complexo, que pela WHO (HAMPE & MISDORP, 1974) refere-se ao carcinoma com proliferação de células mioepiteliais e relata que a invasão em vasos linfáticos é considerada rara nesse tipo de tumor. Quando não há proliferação de células mioepiteliais o carcinoma é considerado simples (HAMPE & MISDORP, 1974). Já Moulton (1990), inclui os tumores com proliferação de células mioepiteliais em tumores mistos e em mioepiteliomas e não concorda com a divisão da WHO em complexo e simples.

Nesse trabalho utilizou-se a classificação de Cassali et al., (2011), que apresenta propostas sobre padronizações dos diagnósticos, fatores prognósticos e tratamentos das neoplasias mamárias caninas no Brasil. As neoplasias foram classificadas em adenomas, que são neoplasias benignas, bem diferenciadas com presença de células epiteliais e/ou mioepiteliais. Carcinomas tubulares, caracterizados por proliferação de células epiteliais arranjadas em túbulos. A quantidade de estroma pode variar consideravelmente. Esses tumores apresentam forte tendência a infiltrar em tecidos adjacentes e vasos (CASSALI, 2002; CASSALI et al., 2011). Carcinomas papilares que são tumores com proliferação de células epiteliais histologicamente semelhantes a formações papilares ou arbóreas com estroma fibrovascular central. Esses tumores devem ser diferenciados de papilomas com carcinoma in situ, carcinomas papilares não invasivos e invasivos. O carcinoma sólido é um tipo frequente de carcinoma em cães. Microscopicamente há proliferação de células epiteliais organizadas em arranjo sólido, células indiferenciadas e geralmente com grande quantidade de figuras de mitoses



(CASSALI et al., 2011). Carcinoma em tumor misto é um dos tipos mais frequentes de neoplasias mamárias em cadelas. Esses tumores exibem um padrão complexo histológico que consiste de porção epitelial (maligno) e mesenquimal bem diferenciado. Foi comprovado que tanto os componentes epiteliais quanto as células mioepiteliais apresentam o mesmo DNA, sugerindo a possibilidade de ambos os componentes serem originados de uma célula-tronco totipotente (GÄRTNER et al., 1999). A ocorrência de proliferações carcinomatosas não invasivas (in situ) pode ser observada (CASSALI et al., 2011).

Os Carcinossarcomas são tumores contendo áreas carcinomatosas e sarcomatosas. A porção epitelial pode ser caracterizada por células luminiais e/ou mioepiteliais, com padrões sólidos, escamosos, mucinoso e anaplásico. O componente mesenquimal pode ser caracterizado por áreas fibromatosas, condromatosas e osteomatosas (MISDORP et al., 1973). Esses tumores são raros na mulher e apresentam pobre prognóstico quando comparado a outros tipos de carcinomas (TEIXEIRA et al., 1998). Esses tumores apresentam crescimento rápido e as metástases podem ocorrer de ambos os componentes ou só de um deles (MISDORP et al., 1973; CASSALI et al., 2011).

## **II. 2- Células-tronco tumorais**

Resumidamente as células-tronco possuem duas propriedades principais: a habilidade de auto-renovação, pela capacidade de divisão e formação de uma nova célula-tronco; e diferenciação em novas células maduras em um órgão no qual residem (AI-HAJJ & CLARKE, 2004). Essas divisões ocorrem de duas maneiras: simétricas e assimétricas, por exemplo, quando uma célula-tronco mãe é capaz de produzir células filhas idênticas (divisões simétricas) ou quando as divisões são para formar novas células mais diferenciadas (divisões assimétricas) (AI-HAJJ & CLARKE, 2004; CLARK, et al., 2006).

Há uma hierarquia no comportamento das células-tronco. A célula mais importante, com mais funções é a célula tronco embrionária que realiza auto-renovação por tempos prolongados e pode se diferenciar em todos os tipos celulares. Em grau

intermediário, ainda com característica de auto-renovação encontra-se a célula-tronco pluripotente que se diferencia na maioria dos tecidos. E com mais limitações em suas funções existe a célula tronco adulta que sofre diferenciações apenas nos tecidos em que ela se encontra (GREENOW & CLARKE, 2012).

O estudo sobre a causa do câncer vem se desenvolvendo há muitos anos com diferentes conceitos. Por um lado há a hipótese da origem clonal. A idéia de que uma única célula poderia iniciar a carcinogênese, ou seja, uma mutação espontânea em uma célula somática reforçou a teoria da expansão clonal como origem das neoplasias (FIALKOW, 1979; TROSKO, 2009). E a origem multicelular, exemplificada em neoplasias causadas por vírus oncogênicos (FIALKOW, 1979). A hipótese da origem clonal das neoplasias iniciou-se com estudos em Leucemias. Autores sugeriram o envolvimento de células-tronco multipotentes na carcinogênese desse câncer (FIALKOW et al., 1980). Uma idéia sobre carcinogênese bem aceita entre os pesquisadores é que o câncer se desenvolve a partir de um subconjunto de células que se auto-renovam e possuem propriedades análogas a célula-tronco presentes nos órgãos (CLARKE et al., 2006). Nas várias etapas da evolução do câncer, mutações em células-tronco ou em linhagens descendentes da progênie celular conduziram a expansão de novos clones, contribuindo para a formação de um tumor heterogêneo (PETERSEN & POLYAK, 2010).

Essas células com propriedades análogas as células tronco são chamadas de Células Tronco Tumoral (CTT). Para que uma célula se torne cancerígena é preciso uma interação entre instabilidades genéticas e fatores ambientais (TROSKO, 2009). Assim um grupo de células estimularia o crescimento tumoral formando as células-tronco Cancerígenas (CTTs) e outro grupo apresentaria uma progênie não tumoral.

As CTTs são mais resistentes às terapias tradicionais contra o câncer (BAO, 2006; SHAFEE et al., 2008; DIEHN et al., 2009; ORAVECZ-WILSON et al., 2009; LIU et al., 2010), por exemplo, mulheres realizando quimioterapia com paclitaxel e epirrubicina apresentam marcações positivas para ALDH-1 em seus tumores mamários (TANEI et al., 2009). A radioterapia aumenta a marcação do fenótipo CD44+/CD24- em tumores mamários implantados em ratos (PHILLIPS et al., 2006; ZIELSKE et al., 2011). Por outro lado, autores descobriram que o uso de repertaxin, um anti-inflamatório antagonista do receptor CXCR1 e IL-8, reduz a população de CTTs mamárias, produzindo apoptose na população tumoral e reduzindo a ocorrência de metástase em

ratos. Uma possível explicação para a erradicação dessas CTTs mamárias é a atuação na interrupção de sinais que geram o microambiente tumoral favorável (GINESTIER et al., 2010; VELASCO-VELÁZQUEZ et al., 2012).

Uma célula-tronco tecidual normal é dependente das interações com o estroma celular adjacente caracterizando o microambiente ou nicho. Esse nicho mantém as características de auto renovação e a identidade dessas células (CLARKE et al., 2006). Há recíproca comunicação entre as células e o tecido normal, assim o estroma induz o crescimento da neoplasia (BLACKING et al., 2007). Estudos concluíram que as CTTs mamárias possuem a habilidade não só de se diferenciarem em células epiteliais, mas também em linhagens de células endoteliais, reforçando a hipótese de que uma população de células que iniciam o tumor possui características relevantes de células-tronco para crescimento tumoral e vascularização (BUSSOLATI et al., 2009).

Existe uma hipótese de que as CTTs se iniciaram a partir da transição entre epitélio e mesênquima (TEM). Autores demonstraram que a indução de TEM pelas células imortais epiteliais mamárias humanas está associada com aquisições de características de células-tronco (MOREL et al., 2008). Em relação ao mecanismo de ação, a ativação de  $\beta$ -catenina e Akt sustenta a TEM, comprovada com aumento de CD44 nessas células (LI & ZHOU, 2011).

Devido as CTTs não poderem ser isoladas e caracterizadas como uma célula simples, marcadores específicos para superfície de CTTs foram detectados em neoplasias mamárias humanas, com marcação positiva para o CD44 e negativa ou baixa marcação para o CD24. A molécula CD44 pertence a classe I multifuncional de glicoproteínas transmembranas (NAOR et al., 2008), geralmente atua como um receptor específico para o ácido hialurônico. O CD44 está associado principalmente com as proteínas que controlam as alterações extracelulares e atuam na regulação de adesão celular, proliferação, crescimento, sobrevivência, motilidade, migração, angiogênese e diferenciação (DU et al., 2008; NAOR et al., 2008). Além disso, o CD44 desempenha um papel na manutenção da função normal da célula mioepitelial durante o desenvolvimento e está associado com a progressão do câncer (LOUDERBOUGH et al., 2011).

O CD24, também conhecido como antígeno termoestável em ratos, é uma pequena proteína fortemente glicosilada da superfície celular e está ligada à membrana ancorada por um glicosil-fosfatidilinositol (KAY et al., 1990). O CD24 é expresso em

células hematopoiéticas dos ratos incluindo subpopulações de linfócitos B, a maioria dos timócitos, hemácias e neutrófilos. Devido à sua expressão de linhagem específica e bem regulamentada, o CD24 foi tradicionalmente usado como um marcador de diferenciação para células T nos estudos de ontogênese (PONCET et al., 1996). Trabalhos posteriores revelaram que o CD24 não é exclusivamente expresso por células hematopoiéticas, mas também está presente no cérebro em desenvolvimento, bem como em muitas células epiteliais (SHIRASAWA et al., 1993; PONCET et al., 1996). Nos seres humanos, a expressão do CD24 não foi identificada em eritrócitos ou timócitos, mas está presente em uma grande variedade de doenças malignas, incluindo linfoma de células B, carcinoma de células renais, carcinomas pulmonares de células pequenas ou não pequenas, carcinoma hepatocelular, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de bexiga, glioma e neoplasias mamárias (KRISTIANSEN et al., 2004).

A descoberta desses receptores de superfície celular, como marcadores de CTTs foi realizada com a implantação de tumores sólidos mamários humanos em ratos. Esses autores demonstraram que tumores sólidos continham uma pequena população distinta de células com exclusiva habilidade de formar tumores em ratos (não obesos, diabéticos e imunossuprimidos), essas células foram chamadas de células tumorigênicas ou células iniciadoras de câncer (AL-HAJJ et al., 2003). Para melhor compreensão da atuação dessas células-tronco, os autores (PONTI et al., 2005) criaram um modelo de estudo *in vitro*, constituído por uma mamosfera com culturas celulares separadas com auxílio de citometria de fluxo, para obtenção de um fenótipo CD44+/CD24- (AL-HAJJ et al., 2003). Mamosferas são colônias esféricas formadas a partir de uma única célula em cultura, não aderentes, e capaz de induzir a formação de tumor em ratos. Por exemplo, na cultura de células (LA7), uma única célula, com fortes características de CTT possui a capacidade de formar tumores e habilidade para formar estruturas da arquitetura mamária *in vitro* como ductos, alvéolos e expressar e secretar proteínas do leite (ZUCCHI et al., 2007). Além da marcação CD44+/CD24- nas células mantidas nas mamosferas, observa-se também marcação para Oct-4 e aumento da formação de novos vasos sanguíneos (PONTI et al., 2005). A reprodução dessas CTT com capacidade de auto-renovação em mamosferas não foi maior que cinco passagens, sendo necessárias melhores condições para manter essas células *in vitro* (DEY et al., 2009). Já Zucchi et al. (2008) demonstraram que p63 é um regulador chave na manutenção de CTTs. Embora a cultura de células com capacidade de auto-

renovação seja indefinida nas esferas, essas células ainda possuem potencial para iniciar um tumor.

Em neoplasias mamárias caninas já foram observadas as CTTs em mamosferas, sendo que raras células demonstraram capacidade de auto-renovação. As células das glândulas mamárias da esfera conseguiram reproduzir *in vitro* túbulos e alvéolos da árvore mamária (COCOLA et al., 2009). Não se sabe ainda qual célula origina uma CTT, mas provavelmente em neoplasias mamárias humanas, originam-se de células basais (KAI et al., 2010). Em outro estudo canino com mamosferas, a existência de CTTs em neoplasias mamárias mostrou marcação CD44+/CD24- em quatro tipos de linhagens celulares tumorais (MICHISHITA et al., 2011). Abraham et al. (2005) sugeriram que CD44+/CD24- não estão associadas com o prognóstico clínico e sobrevida do paciente com neoplasia mamária humana, mas estão relacionados com metástases distantes, como a metástase óssea.

Os Aldeídos desidrogenases (ALDH) são moléculas que têm sido observadas em células normais e em células-tronco mamárias. Não são somente consideradas marcadores dessas células, mas também desempenham a função de auto-proteção, diferenciação e/ou expansão de populações de células-tronco (MUZIO et al., 2012). Alguns autores encontraram baixa expressão de ALDH em células mais primitivas das glândulas mamárias humanas (EIREW et al., 2012). A expressão de marcadores de CTT como o ALDH-1 em neoplasias mamárias tem sido relacionada com um pobre prognóstico (GINESTIER et al., 2007). Esses autores conseguiram reproduzir neoplasias humanas em ratos, após isolarem essas células (ALDH+), por citometria de fluxo e injetarem em ratos. A partir daí um novo tumor foi implantado nesses animais. Que apresentava células positivas e negativas para ALDH, nas mesmas proporções do tumor primário humano. Linhagens celulares, derivadas de neoplasias mamárias caninas, que apresentam capacidade de auto-renovação (CD44+/CD24-) detectaram altos níveis de ALDH-1 (MICHISHITA et al., 2012). Alguns estudos mostraram que a expressão de ALDH não restringe-se apenas as células epiteliais, mas também as células do estroma (GINESTIER et al., 2007; KUNJU et al., 2011). Há uma ressalva quanto aos clones do ALDH, já que esta molécula apresenta 19 isoformas, sendo o mais estudado o ALDH1A1 que é sinônimo do ALDH1. Autores isolaram essas isoformas e concluíram que, por imuno-histologia, o ALDH1A3 em tecidos mamários humanos apresentaram boa correlação com a metástase (MARCATO et al., 2011).

Autores sugerem que em carcinomas de células escamosas da língua em humanos, o ALDH pode ser considerado um marcador de células-tronco (ZOU et al., 2012).

A regulação do comportamento de células-tronco incluem mecanismos específicos para duas características importantes: pluripotência e o potencial de proliferação ilimitado. Células-tronco normais podem permanecer em um estado indiferenciado, o que lhes dá o potencial para auto-renovação com tempo de vida ilimitado, ou elas rapidamente começam a diferenciar-se e a perde a sua capacidade única de auto-renovação. Uma das vias que mantém a pluripotência das células-tronco é o fator de transcrição octâmero 4 (Oct4). O gene Oct4, um membro da família POU de fatores de transcrição, foi mostrado para ser expresso tanto em células embrionárias como em células-tronco adultas. Investigações recentes indicam que Oct4 está envolvido não só no controle como na manutenção de células-tronco embrionárias (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000).

Em neoplasias mamárias humanas, o Oct-4 foi altamente expresso em células tumorais CD44+/CD24-, e pode ser um potente biomarcador para início, progressão e diferenciação nos tumores de mama humanos (LIU et al., 2011). Os fatores de transcrição foram relacionados com neoplasias mamárias de alto grau, ou seja, as indiferenciadas (BEN-PORATH et al., 2008). Estudos também associaram que em situações de estresses o Oct-4 desempenha função anti-apoptótica, provavelmente mediado pela via STAT-3 (GUO et al., 2008). Outro estudo também indica que o Oct4 mantém a sobrevivência de CTTs por inibição da apoptose (HU et al., 2008). Sendo a diminuição de Oct-4 relacionada a apoptose de células germinativas primordiais (KEHLER et al., 2004). Em cães, um estudo com mamosfera, além de outros marcadores para CTTs, autores encontraram a expressão de Oct-4 somente nas células da periferia da esfera, uma possível explicação seria o fato das células centrais já terem iniciado o processo de diferenciação (FERLETTA et al., 2011). E ainda em um estudo humano, autores não encontraram a presença de Oct-4 por imunofluorescência, RT-PCR e por Western Blot em duas linhagens de neoplasias mamárias e encontraram no controle positivo (teratoma) (CANTZ et al., 2008).

A ocorrência de metástase é a causa da morte dos pacientes com neoplasias mamárias. As CTTs têm sido consideradas responsáveis pela doença metastática. Acredita-se que a migração de CTTs contribuam para expansão da massa tumoral, invasão a curta distância e metástases distantes (BRABLETZ et al., 2005). As CTTs

mamárias aumentam a motilidade celular e aumentam a expressão de genes que promovem a metástase (LIU et al., 2010; VELASCO-VELÁZQUEZ et al., 2012). Embora seja letal quando ela tem sucesso, os múltiplos passos de um processo metastático tende a um alto grau de ineficiência. Estudos acreditam que raras subpopulações de células do tumor primário consigam completar os passos da metástase. Sendo esse processo dependente do local secundário (microambiente tumoral). Autores acreditam que essas raras subpopulações de células sejam as CTTs (CHU & ALLAN, 2011).

Como indicador de prognóstico tem sido proposto a quantificação de CTTs. Para que isso seja transposto como realidade clínica é preciso à identificação dessas CTTs em métodos imuno-histoquímicos em tecidos parafinados. As CTTs em neoplasias mamárias caninas já foram comprovadas por citometria de fluxo e PCR. Em mulheres autores já identificaram essas CTTs em neoplasias mamárias por imuno-histoquímica. A identificação dessas CTTs ,por imuno-histoquímica continua contribuindo para o estudo da carcinogênese, identificando as neoplasias resistentes a quimioterápicos e as com pior prognóstico. Os resultados também contribuem para os estudos envolvendo patologia experimental comparada das neoplasias mamárias.

### III. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Detectar a presença de células-tronco tumorais por meio da reação de imuno-histoquímica em neoplasias mamárias caninas e em metástases.
- Padronizar as reações imuno-histoquímicas para os anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1, que são marcadores de CTTs.
- Relacionar o fenótipo CD44+/CD24- obtido pela técnica de imuno-histoquímica com o tipo e grau histológico das neoplasias mamárias caninas.
- Relacionar os marcadores de CTTs Oct-4 e ALDH-1 com o tipo e grau histológico das neoplasias mamárias caninas.
- Avaliar a imunomarcacão desses marcadores (CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1) nos componentes epiteliais e mesenquimais de carcinossarcomas mamários.



## IV- MATERIAL E MÉTODOS

### IV.1- Grupos experimentais:

Um total de 136 neoplasias malignas e benignas foi selecionado do arquivo do Departamento de Patologia Veterinária (FCAV-UNESP Jaboticabal), incluídas em blocos de parafina e as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. As neoplasias malignas foram compostas por carcinomas mamários tubulares, papilares e carcinomas em tumores mistos graus I, II e III. Foram também selecionados carcinossarcomas, carcinomas sólidos grau II e II, metástases e adenomas, conforme a tabela 1.

As neoplasias foram reclassificadas de acordo com os critérios do Consenso em Neoplasias Mamárias (CASSALI et al., 2011). Para o carcinoma sólido grau I não foram encontradas amostras em número suficiente para este grau.

Tabela 1. Número de amostras de neoplasias mamárias caninas divididas em tipo e grau histológico.

Núm. de amostras	Tipo histológico
12	Carcinoma mamário padrão tubular grau I
12	Carcinoma mamário padrão tubular grau II
10	Carcinoma mamário padrão tubular grau III
10	Carcinoma mamário padrão papilar grau I
8	Carcinoma mamário padrão papilar grau II
8	Carcinoma mamário padrão papilar grau III
11	Carcinoma mamário padrão sólido grau II
10	Carcinoma mamário padrão sólido grau III
11	Carcinoma em tumor misto grau I
11	Carcinoma em tumor misto grau II
10	Carcinoma em tumor misto grau III
6	Carcinossarcomas
8	Metástases
9	Adenomas

O grau de malignidade em cadelas foi proposto por Misdorp (1999), associando as formações de túbulos, hipercromatismo, mitoses e pleomorfismo nuclear, de acordo com o Anexo A.

#### IV.2- Análise Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica foram utilizados cortes de tecidos neoplásicos mamários incluídos em parafina, para todos os anticorpos (CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em tecidos de neoplasias mamárias caninas.

<b>Anticorpos</b>	<b>Clones</b>	<b>Diluições</b>	<b>Procedência</b>
CD44, HCAM (M)*	IM7	1:100	Santa Cruz, ref. 18849
CD24 (M)	M1/69	1:75	Santa Cruz, ref. 19651
Oct-4 (P)	RbpAb	1:1000	Abcam, ref Ab19857.
ALDH-1 (M)	44/ALDH	1:200	BD, ref 611194

\*M=monoclonal e P=policlonal

A técnica de imuno-histoquímica empregada foi o método do polímero, desenvolvido por HSU et al., (1981), com ligeiras modificações. Os cortes de tecido com 4 µ foram desparafinizados, reidratados e, então, incubados por vinte minutos em uma solução a 10% de peróxido de hidrogênio (30 volumes/MERCK) em metanol absoluto (Synth), para bloqueio da peroxidase endógena por trinta minutos. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão (Pascal, DAKO). Apenas para o anticorpo CD24 usou-se como solução tampão Tris-EDTA, pH 9,0, para os demais anticorpos foi utilizado o tampão citrato pH 6,0. Após essa etapa, os cortes foram lavados por três vezes em solução tris HCL, (pH 7,4) por 5 min e, a seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (*protein block serum-free* – DAKO ref. X0909). Ato contínuo, os cortes foram incubados

em câmara úmida com os anticorpos primários na diluição ótima (Tab. 1), a 4°C por 18 horas. Apenas o anticorpo CD44 foi incubado a 28°C por uma hora. Depois os cortes foram novamente lavados em PBS, procedendo-se então a incubação com o polímero ligado a peroxidase, (*kit ENVISION + Dual Link System Peroxidase* ref K4061 - DAKO). Para os anticorpos CD24 e ALDH-1, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado após a incubação do anticorpo primário. As lâminas foram novamente lavadas, e a reação revelada pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB – DAKO, ref. K3466).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem em água destilada, seguidas de contra coloração com Hematoxilina de Harris (1-2 minutos). Os cortes passaram pela bateria crescente de álcool e por xilol, foram montados com Permount (Fisher Scientific) e observados em microscopia de luz.

Para os anticorpos CD44 e CD24 foram usados como controle positivo, neoplasias mamárias humanas sabidamente marcadas para estes anticorpos. Essas neoplasias foram cedidas gentilmente pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP em Ribeirão Preto-SP. A utilização do material humano foi aprovado pela Comissão de ética em pesquisa do HCRP e da FMRP/USP (processo 242/2011). Para os anticorpos ALDH-1 e Oct-4 foram usados controles positivos internos da própria lâmina, o bulbo do folículo piloso na derme.

Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components, ref. S3022, DAKO) em todas as reações imuno-histoquímicas.

#### IV-3- Contagem das células marcadas

A observação das células foi feita em microscópio de luz binocular com equipamento para fotomicrografia digital (Nikon E200). Antes da contagem, foram feitas observações quanto ao tipo de células marcadas e a distribuição da marcação. Para a quantidade de células imunomarcadas foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e foi contado um total de 100 células entre as marcadas e as não

marcadas, utilizando-se objetiva de 40x. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas. Nos grupos dos carcinomas em tumores mistos foram contadas apenas as células epiteliais neoplásicas. Para o grupo carcinossarcomas foram contadas tanto as células epiteliais como as mesenquimais neoplásicas.

#### IV.4 - Análise estatística

Duas análises estatísticas foram realizadas para os anticorpos CD44 e CD24. Inicialmente juntaram-se todos os tipos e graus histológicos, exceto o grupo do carcinossarcoma para uma correlação de Pearson, seguida de Regressão linear simples. Essas análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

Foram realizadas comparações entre graus histológicos nos carcinomas tubulares, papilares, carcinomas em tumores mistos e sólidos. Nos grupos de metástase e adenomas foram comparadas as médias entre os anticorpos CD44, CD24 e Oct-4 para os dois grupos e ALDH-1 apenas para o grupo de metástase. Para o tipo histológico carcinossarcoma comparou-se as imunomarcações das porções epiteliais com as imunomarcações da porção mesenquimal de cada tumor para os quatro anticorpos (CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1).

Essas análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa computacional Graphpad Prisma (versão 4.0, 2003). Para as comparações nos carcinomas mamários tubulares, papilares, carcinomas em tumores mistos, adenomas e metástases o teste utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltipla de Dunn's, considerando significativo quando  $p < 0,05$ . Nos carcinomas sólidos (Graus II e III), e nos carcinossarcomas (porção epitelial x porção mesenquimal) foi utilizado o teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

## V- RESULTADOS

Para o anticorpo CD44 a imunomarcacão ocorreu em membrana plasmática, assim confirmada com o seu controle positivo, neoplasia mamária humana sabidamente marcada com CD44 clone IM7. As imunomarcaces nos carcinomas papilares foram observadas nas áreas mais externas das papilas (Figura 1). Nos carcinomas sólidos observou-se marcaces em células mioepiteliais e fortemente nas epiteliais (Figura 2). As mesmas neoplasias testadas para o anticorpo CD24 não apresentaram imunomarcaces (Figura 3). Já nos carcinomas em tumores mistos a imunomarcacão para o CD44 ocorreu apenas em células epiteliais e não nos tecidos mesenquimais bem diferenciados (Figuras 4 e 5). Ainda para o CD44, nos locais das metástases, as células indiferenciadas metastáticas apresentaram acentuadas marcaces em membrana plasmática (Figuras 6 e 7).

Em relao ao anticorpo CD24, pode se observar maior número de células marcadas em neoplasias grau I (Figura 8 e 9). Já nos tumores grau II e III notou-se poucas ou raras imunomarcaces em células neoplásicas, assim como ausência de marcao em células metastáticas (Figura 10). O controle positivo utilizado foi tecido parafinizado de tonsila humana, sendo a imunomarcacão em membrana plasmática e em citoplasma.

Para o anticorpo Oct-4 notou-se que as imunomarcaces foram nucleares, comprovadas em seus controles positivos internos, bulbo do folículo piloso . Em relao  intensidade, observou-se imunomarcacão extremamente forte em células epiteliais mamárias bem diferenciadas (Figuras 11 e 12). Em células menos diferenciadas a intensidade de imunomarcacão diminuía, ou seja, em células histologicamente mais indiferenciadas, a imunomarcacão se tornava mais fraca ou ausente, como nos casos das células das metástases (Figura 13). Nessas células observou-se algumas marcaces citoplasmáticas. As imunomarcaces citoplasmáticas não foram consideradas na contagem percentual.

A imunomarcacão com o anticorpo ALDH-1 não foram observadas na maioria dos tipos histológicos, e quando presente não ultrapassou 10% das células imunomarcadas. Essas marcaces ocorreram nas membranas plasmáticas e no citoplasma e estavam intensamente corados (Figuras 14 a 16). Alguns ductos mamários

normais localizados em algumas neoplasias foram imunomarcados para este anticorpo (Figura 17). A ausência de marcação também ocorreu nas metástases (Figura 18).

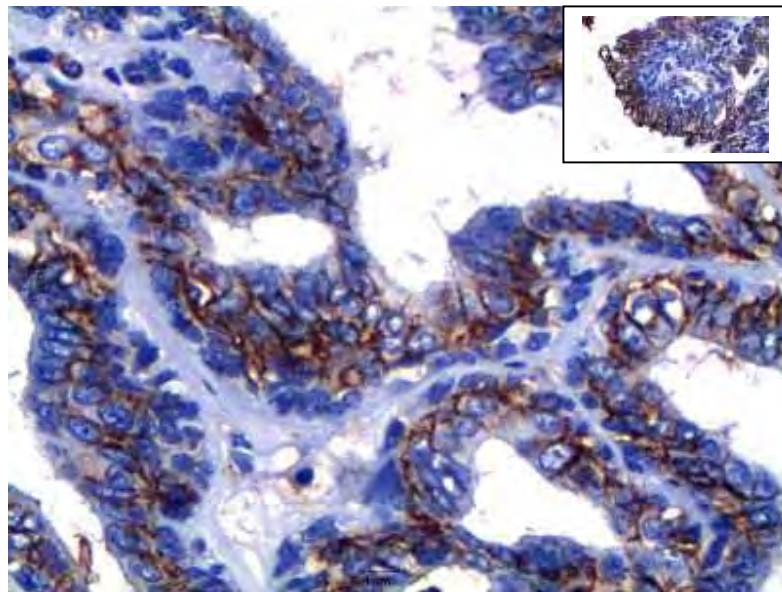


Figura 1: Fotomicrografia de carcinoma mamário papilar grau I em cadela. Notar marcação imunohistoquímica para CD44, observada na membrana plasmática das células epiteliais neoplásicas mais externas nas papilas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

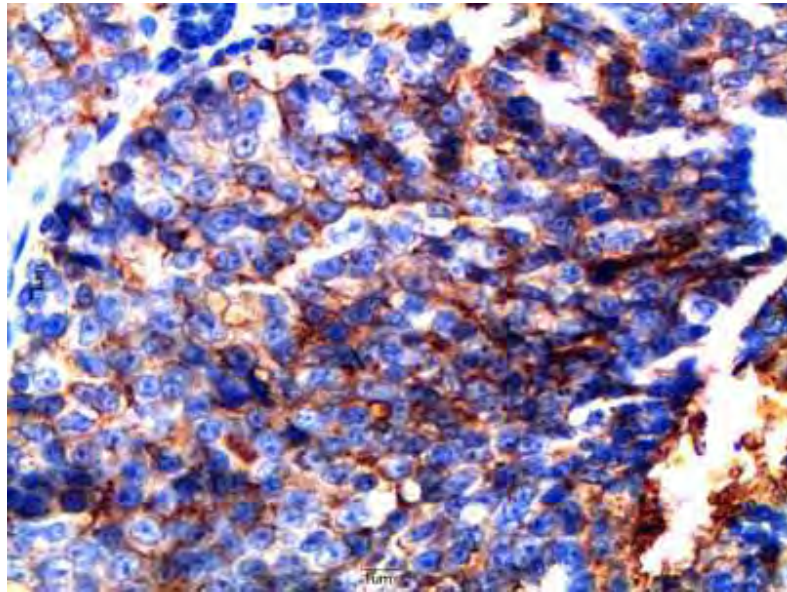


Figura 2: Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido grau III em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para CD44, observada na membrana plasmática das células epiteliais neoplásicas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

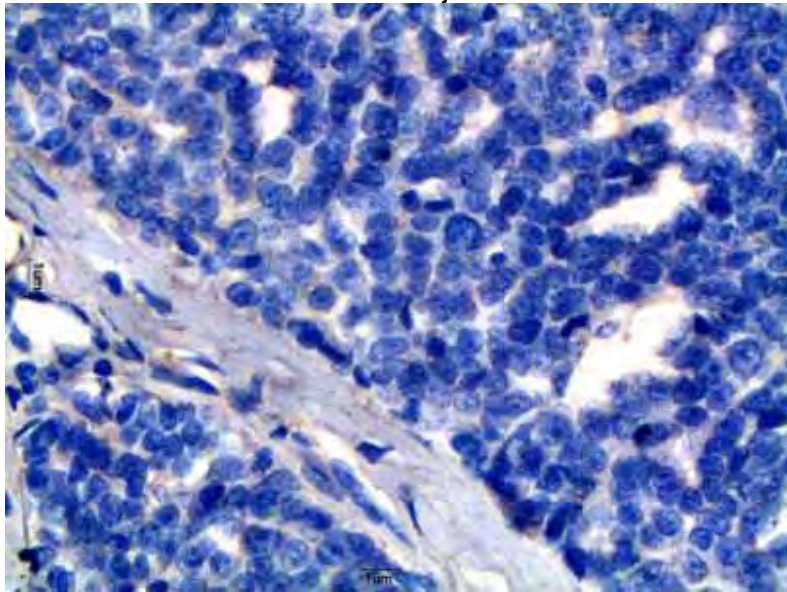


Figura 3: Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido grau III em cadela. Notar ausência de imunomarcacão em células epiteliais na Reação imuno-histoquímica para CD24. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

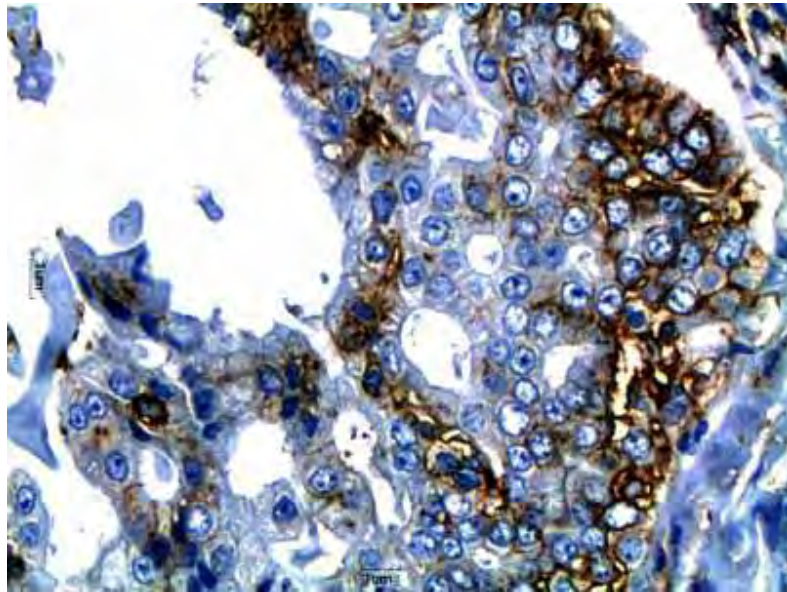


Figura 4: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para CD44, observada na membrana plasmática das células epiteliais neoplásicas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

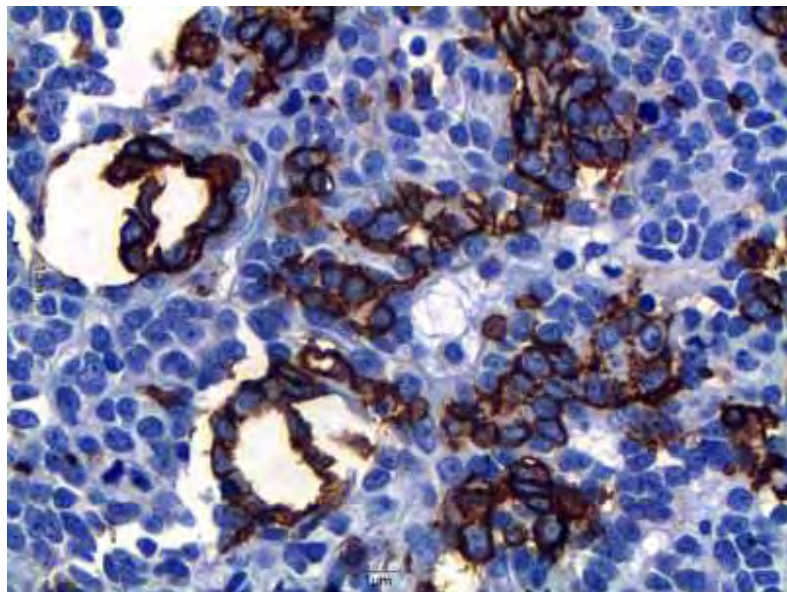


Figura 5: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau II em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para CD44, observada na membrana plasmática das células epiteliais neoplásicas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris.



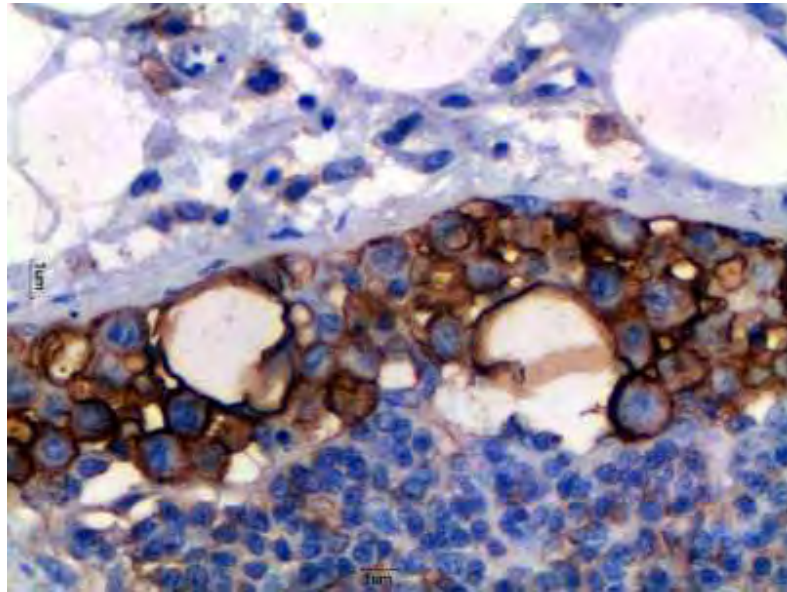


Figura 6: Fotomicrografia de neoplasia mamária maligna canina. Observar Marcação imuno-histoquímica para CD44 observada na membrana plasmática das células epiteliais indiferenciadas localizadas em linfonodo. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

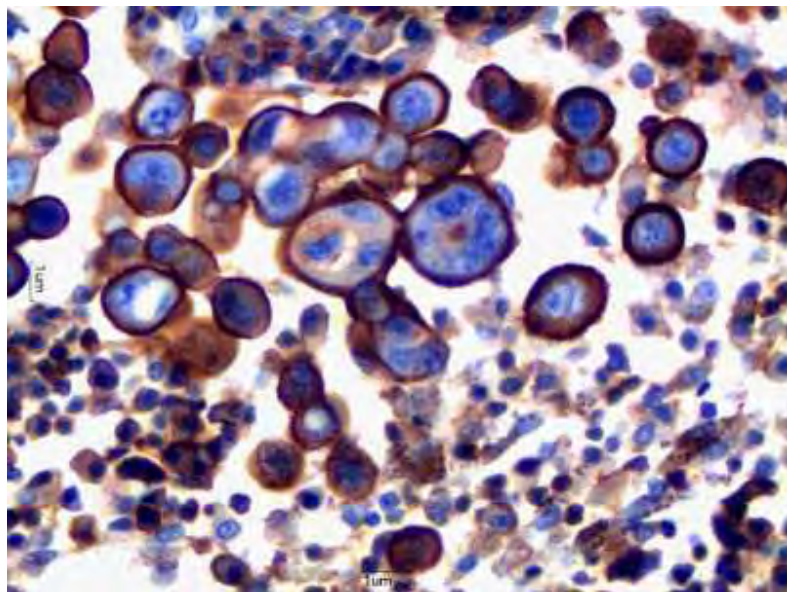


Figura 7: Fotomicrografia de neoplasia mamária canina. Observar marcação imuno-histoquímica para CD44 na membrana plasmática das células epiteliais indiferenciadas neoplásicas localizadas em linfonodo. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

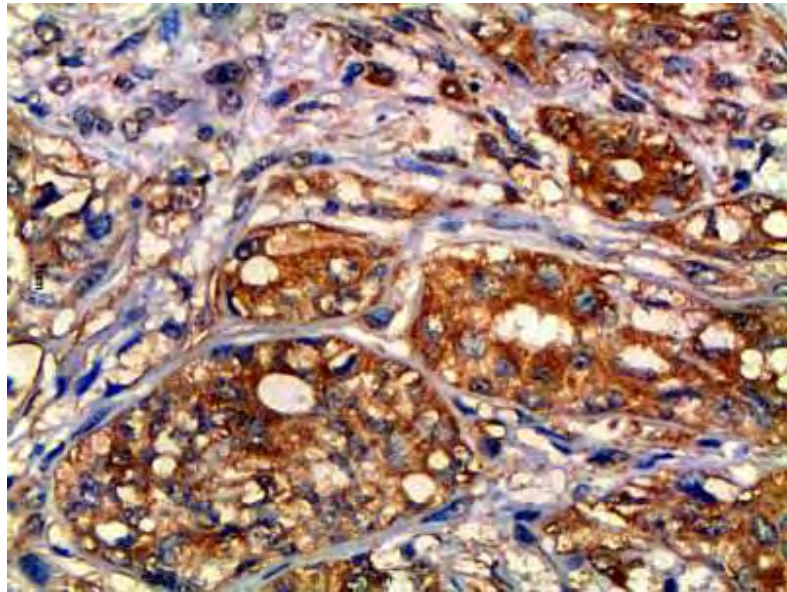


Figura 8: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para CD24, observada na membrana plasmática e citoplasma das células epiteliais neoplásicas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

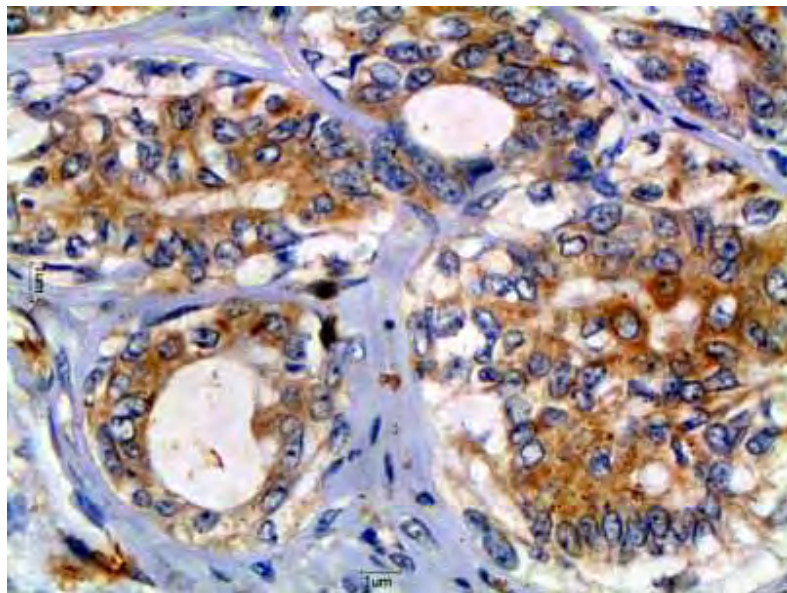


Figura 9: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para CD24, observada na membrana plasmática e citoplasma das células epiteliais neoplásicas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

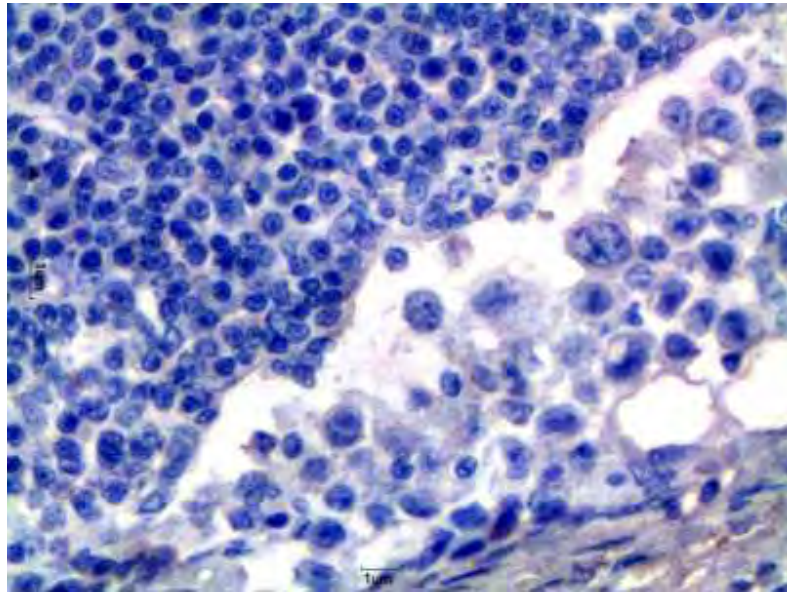


Figura 10: Fotomicrografia de neoplasia mamária maligna em cadela. Notar ausência de imunomarcção nas células metastáticas em linfonodo. Reação de imuno-histoquímica para o anticorpo CD24. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

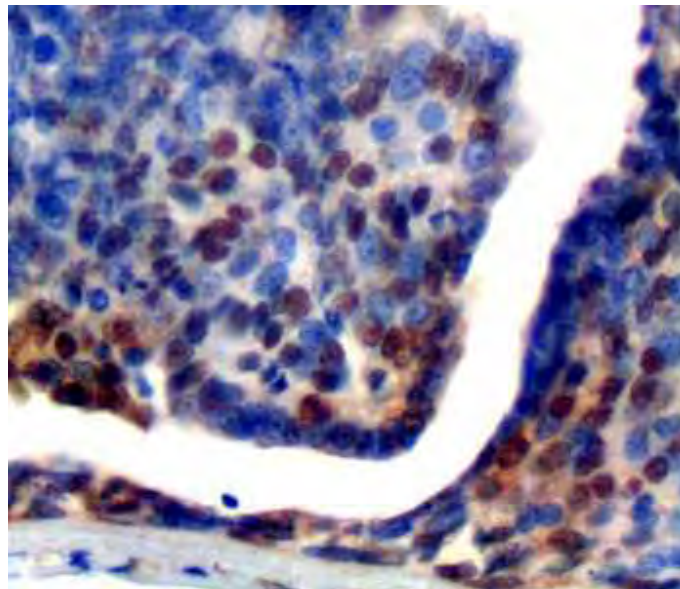


Figura 11: Fotomicrografia de neoplasia mamária canina. Notar marcação imuno-histoquímica em núcleos de células epiteliais em para Oct-4. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

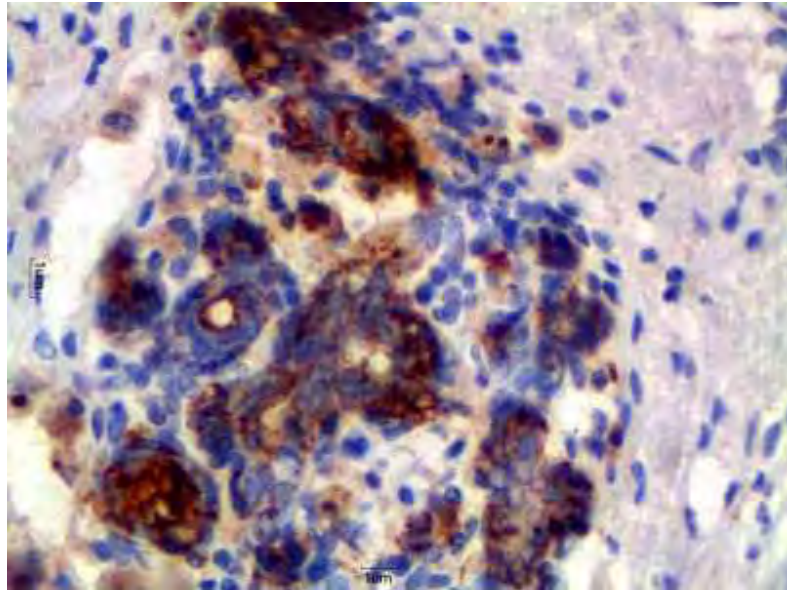


Figura 12: Fotomicrografia de neoplasia mamária canina. Notar marcação imuno-histoquímica nuclear para Oct-4. As marcações ocorreram em células epiteliais mamárias bem diferenciadas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x

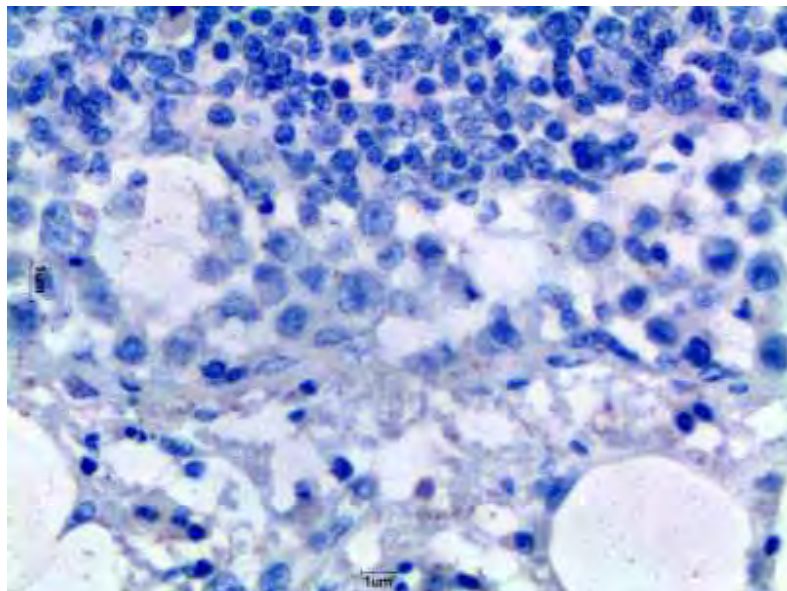


Figura 13: Fotomicrografia de neoplasia mamária maligna com metástase em linfonodo. Notar ausência de marcação em células epiteliais indiferenciadas na reação de imuno-histoquímica para Oct-4. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

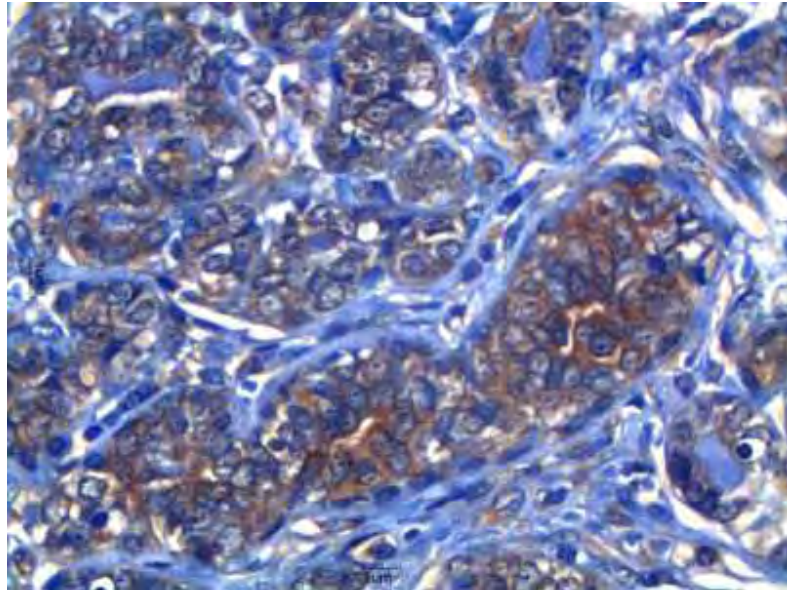


Figura 14: Fotomicrografia de carcinoma mamário sólido grau II em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para ALDH-1 em citoplasmas de células epiteliais indiferenciadas. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

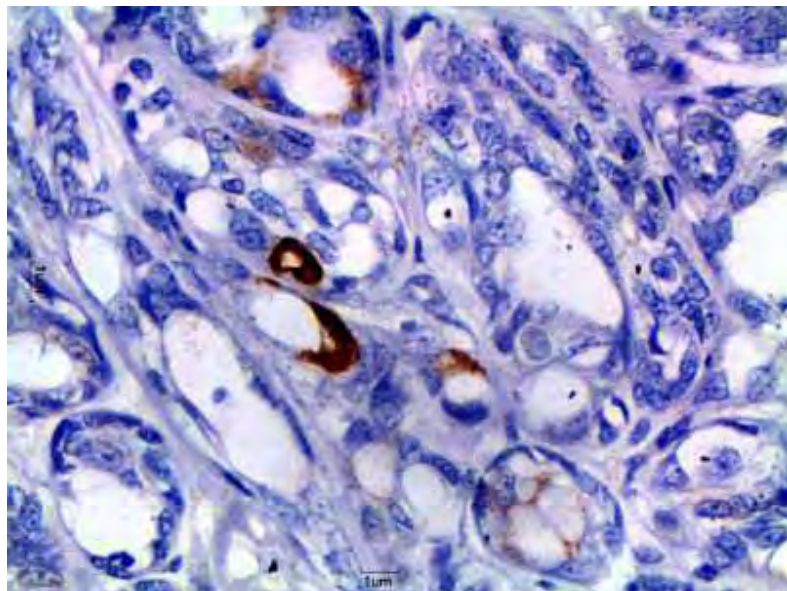


Figura 15: Fotomicrografia de carcinoma mamário tubular grau II em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica em citoplasma para ALDH-1. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

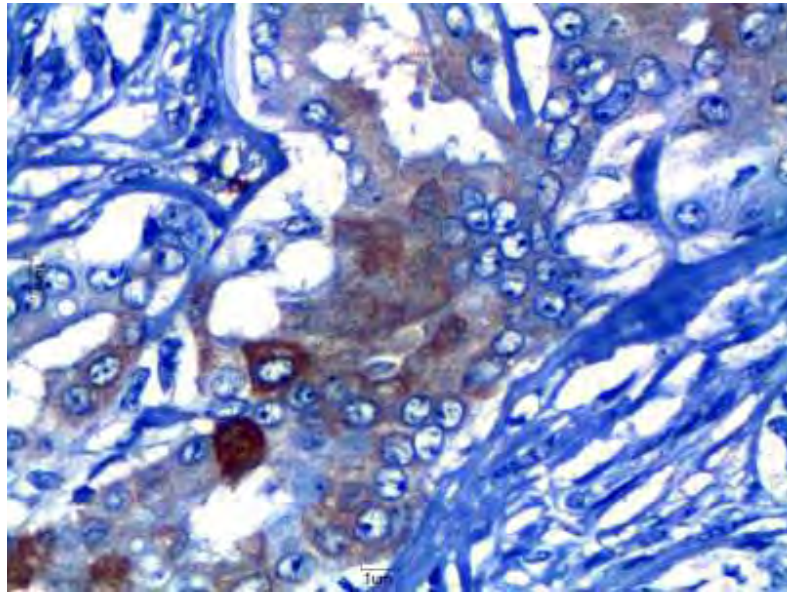


Figura 16: Fotomicrografia de carcinoma em tumor misto grau I em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para ALDH-1 em citoplasma de células epiteliais. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

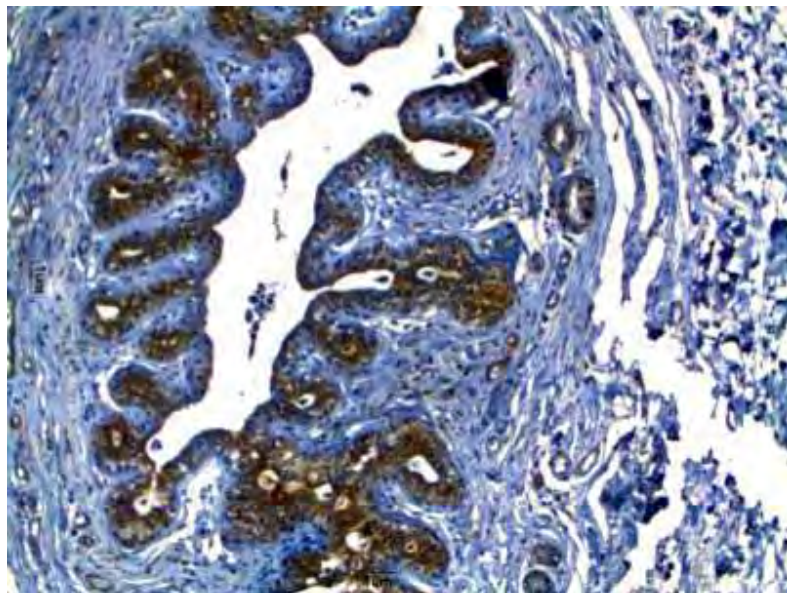


Figura 17: Fotomicrografia de ducto mamário em cadela. Notar marcação imuno-histoquímica para ALDH-1 em citoplasmas de células epiteliais. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

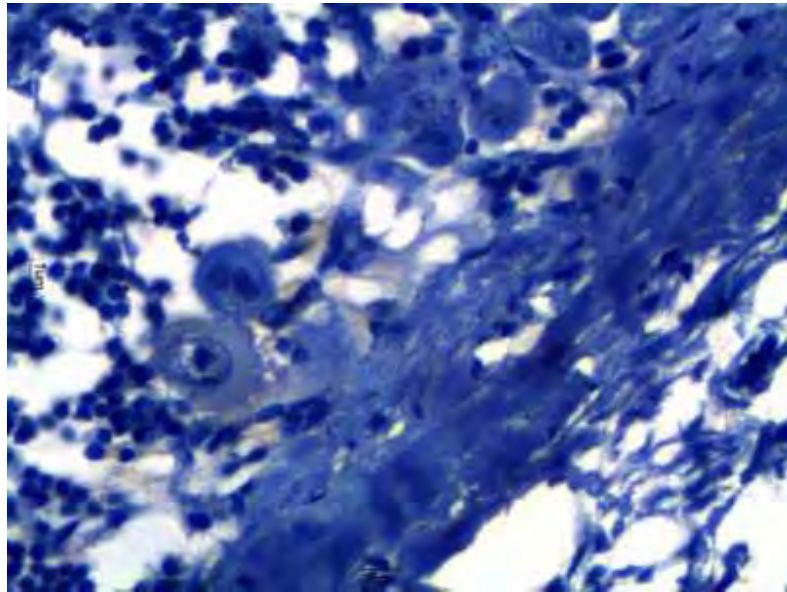


Figura 18: Fotomicrografia de neoplasia mamária maligna canina metastática em linfonodo. Notar ausência de marcação em células epiteliais indiferenciadas na reação imuno-histoquímica para ALDH-1. DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

As médias e seus respectivos erros-padrão, de todos os grupos, estão descritos no anexo B.

No teste de correlação de Person foram analisadas 130 amostras (todos os grupos menos o carcinosarcoma) para os anticorpos CD44 e CD24. A correlação foi significativo com  $p=0,0045$ . A partir do valor do intercepto  $46,75\% \pm 2,34$  é indicativo que o aumento de CD44 causa a diminuição do CD24 avaliado por uma linha de regressão como mostrado na figura 19.

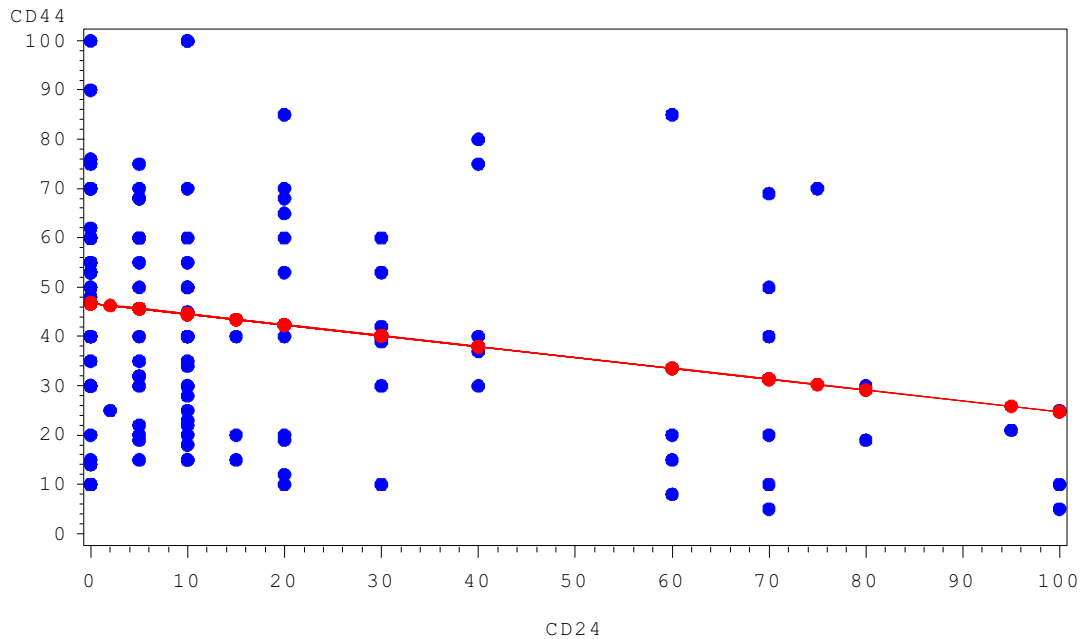


Figura 19: Linha de regressão linear pelo teste de correlação de Pearson, sendo CD44 o eixo y e o CD24 o eixo x. O valor onde CD44 é positivo e CD24 torna-se zero é 46,75%.

Sendo assim, dentre as 130 amostras analisadas, os tumores que foram positivos para essa correlação estão representados na tabela 3. Essas neoplasias assumiram o fenótipo CD44+/CD24-. Das 130 amostras, 40 expressaram esse fenótipo sendo 37 de graus elevados como II, III e metástases e apenas três neoplasias foram grau I. As médias de imunomarcações para os anticorpos CD44 e CD24 foram respectivamente 62,2% e 0%.



Tabela 3: Identificação das neoplasias mamárias caninas expressando o fenótipo CD44+/CD24-

Neoplasia	Número de animais com o fenótipo CD44+/CD24-
Carcinoma tubular grau I	2
Carcinoma tubular grau II	5
Carcinoma tubular grau III	5
Carcinoma papilar grau I	1
Carcinoma papilar grau II	2
Carcinoma papilar grau III	4
Carcinoma sólido II	1
Carcinoma sólido III	2
Carcinoma em Tumor Misto grau I	1
Carcinoma em Tumor Misto grau II	4
Carcinoma em Tumor Misto grau III	6
Metástases	7
<b>Total</b>	<b>40</b>

Nas comparações dos carcinomas tubulares houve aumento significativo ( $p=0,0253$ ) do tubular I para o tubular III para o anticorpo CD44 (Figura 20A). Em relação ao anticorpo CD24 nos carcinomas tubulares houve diminuição significativa ( $p=0,0288$ ) das células imunomarcadas do grau I para o grau II (Figura 20B). Ainda nos tubulares a marcação para o anticorpo Oct-4 foi altamente significativo ( $p=0,0002$ ) na comparação do grau I com o grau III e do grau II com o grau III (Figura 20C). E para o anticorpo ALDH-1 nos carcinomas tubulares não houve diferença significativa entre os graus,  $p=0,4865$  (Figura 20D).

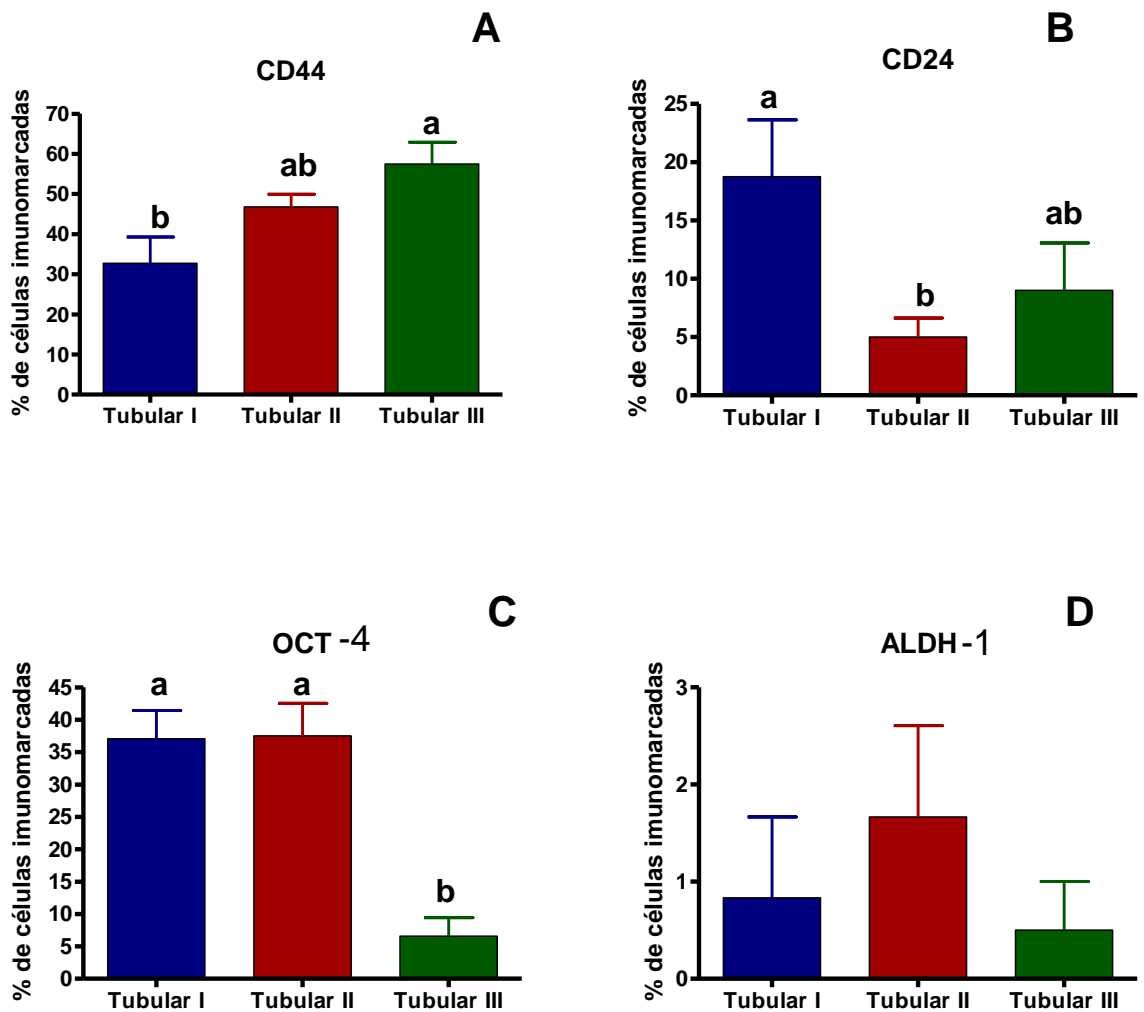


Figura 20: Porcentagem de imunomarcção para o anticorpo CD44 (A), CD24 (B), Oct-4 (C) e ALDH-1 (D) nos carcinomas tubulares grau I, II e III de cães. Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Em relação aos carcinomas papilares, não houve diferença significativa ( $p=0,3926$ ) na imunomarcção para o anticorpo CD44 (Figura 21A). Já para o anticorpo CD24 houve diminuição significativa ( $p=0,0186$ ) do grau I para o grau III nos carcinomas papilares (Figura 21B). Para o anticorpo Oct-4 não houve diferença estatística ( $p=0,1484$ ) entre os graus (Figura 21C). No ALDH-1 não houve imunomarcção em nenhum grau histológico.

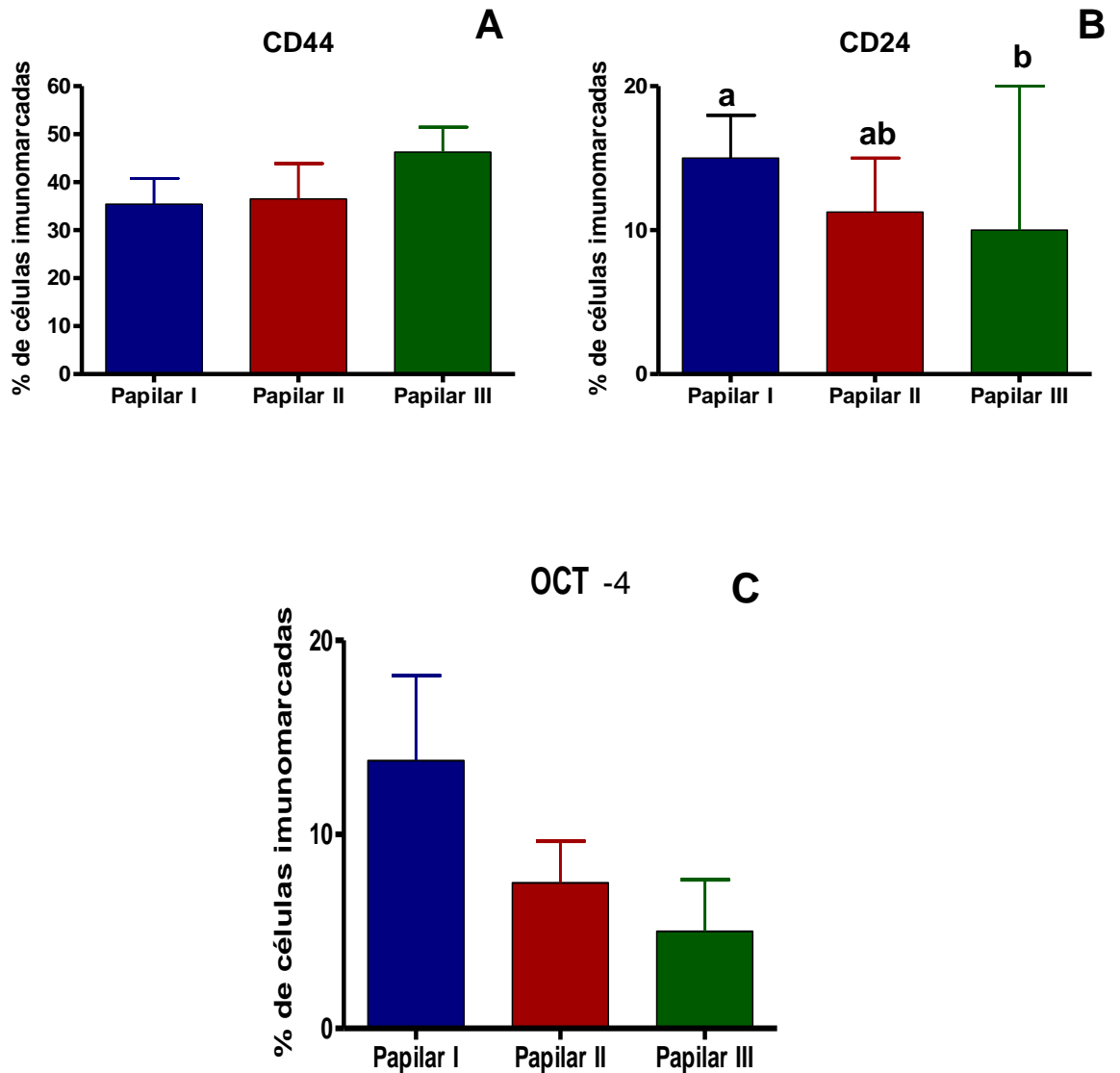


Figura 21: Porcentagem de imunomarcção para o anticorpo CD44 (A), CD24 (B) e Oct-4 (C) nos carcinomas papilares grau I, II e III de cães. Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Nos carcinomas sólidos foram comparados apenas grau II com grau III (teste de Mann Whitney). Para os anticorpos CD44 ( $p=0,9438$ ) e CD24 ( $p=0,6949$ ) não houve diferença entre os graus (Figura 22 A e B). Para o Oct-4 notou-se aumento significativo do número de células marcadas ( $p=0,0439$ ) do grau II em relação ao grau III (Figura 22C). No carcinoma sólido grau II pode-se notar imunomarcções em alguns tumores para o anticorpo ALDH-1, sendo ausente a marcação nos carcinomas sólidos grau III.

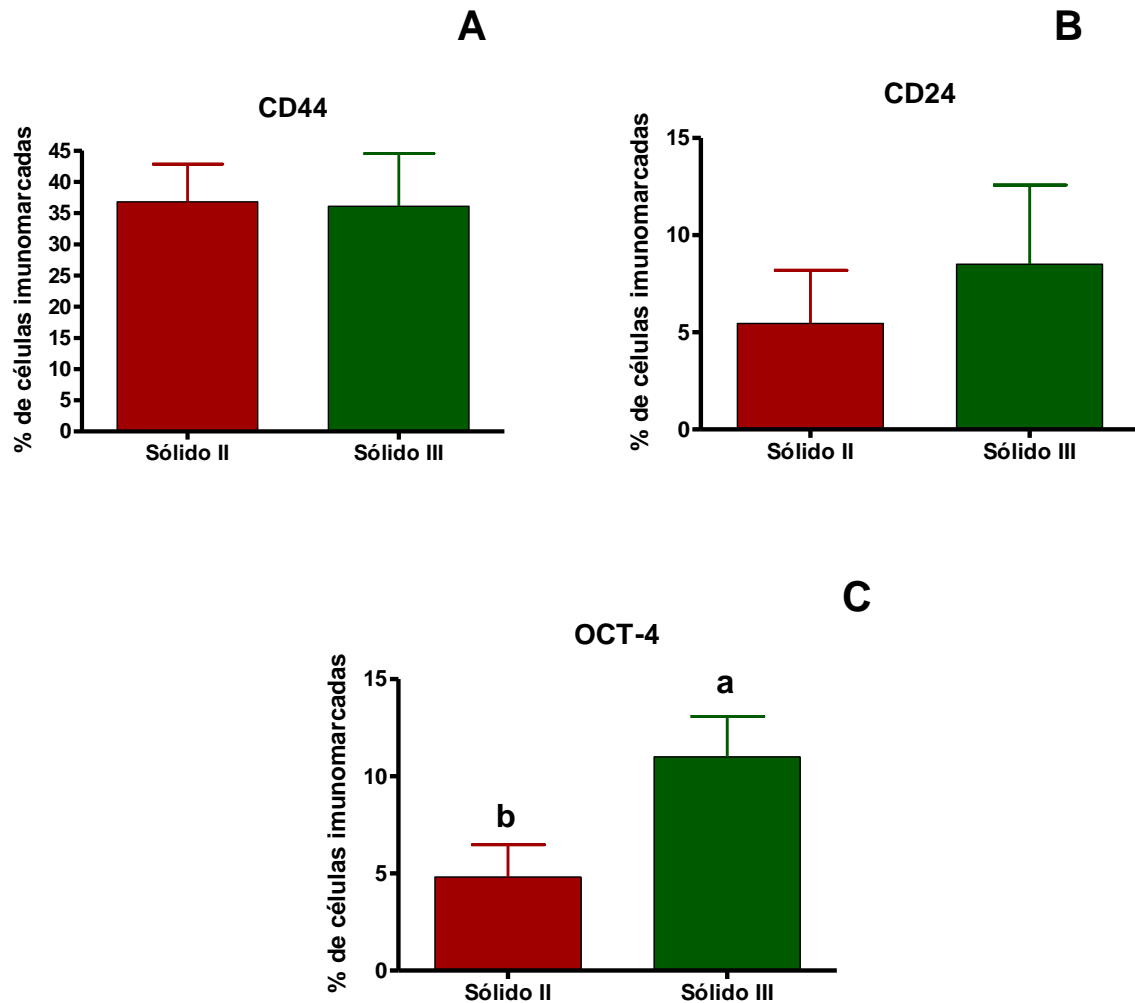


Figura 22: Porcentagem de imunomarcção para o anticorpo CD44 (A), CD24 (B) e Oct-4 (C) nos carcinomas sólidos grau II e III de cães. Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Nas comparações dos Carcinomas em tumores mistos não houve diferença estatística entre os graus para os anticorpos CD44 ( $p=0,8163$ ), CD24 ( $p=0,2873$ ) e Oct-4 ( $p=0,0692$ ) (Figuras 23 A, B e C, respectivamente). No anticorpo ALDH-1 apenas um tumor marcou positivo no grau I.

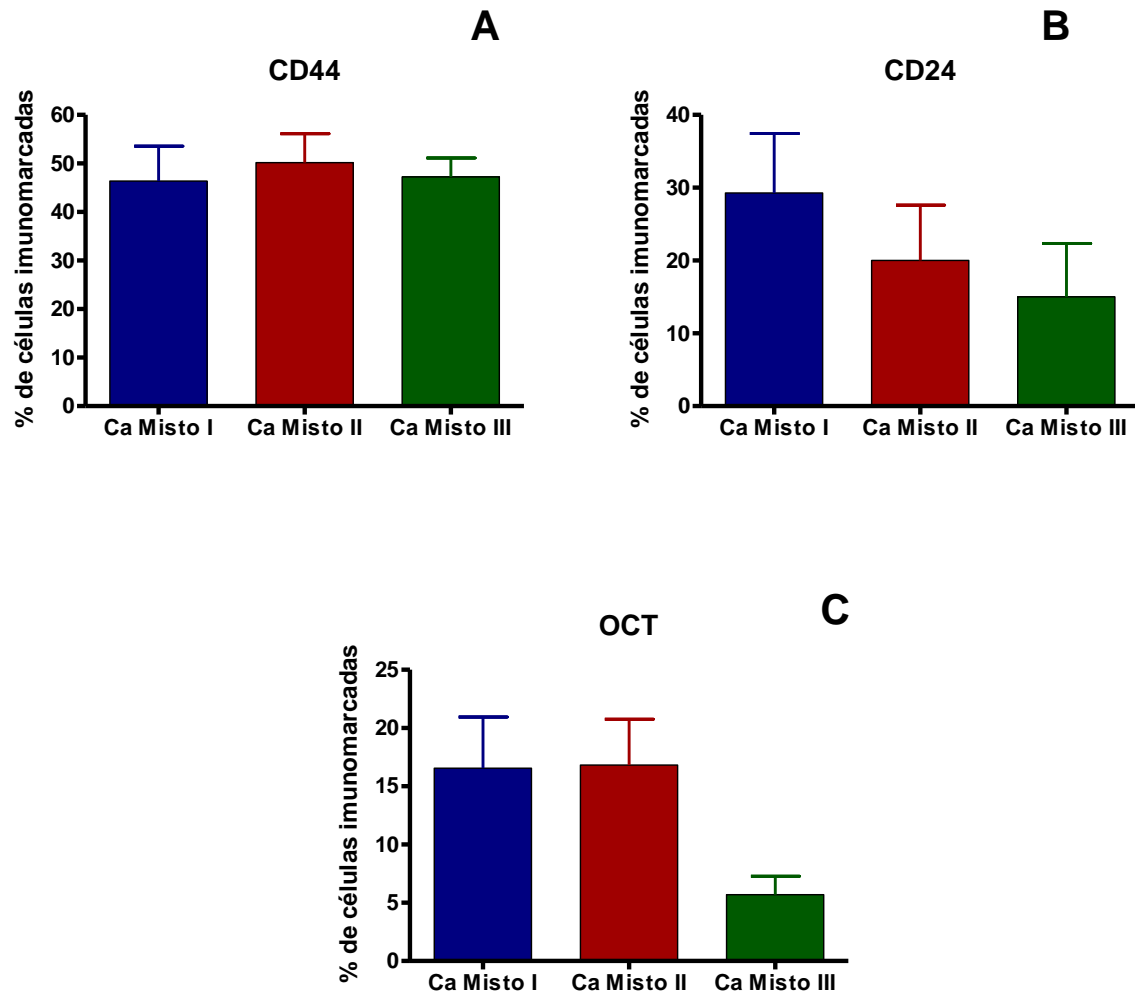


Figura 23: Porcentagem de imunomarcção para o anticorpo CD44 (A), CD24 (B) e Oct-4 (C) nos carcinomas em tumores mistos grau I, II e III de cães. Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

No grupo dos adenomas realizou-se comparações entre as células marcadas pelos anticorpos, sendo visualizado um aumento significativo ( $p=0,0001$ ) do CD44 para o CD24, e aumento significativo do CD44 para o Oct-4 (Figura 24A). O uso do anticorpo ALDH-1 não revelou marcação positiva em nenhuma célula deste grupo.

Nas comparações para o grupo Metástase foram analisadas as marcações para os quatro anticorpos. Os resultados demonstram diminuições significativas ( $p=0,0001$ ) do CD44 para os anticorpos CD24, Oct-4 e ALDH-1 (Figura 24B).

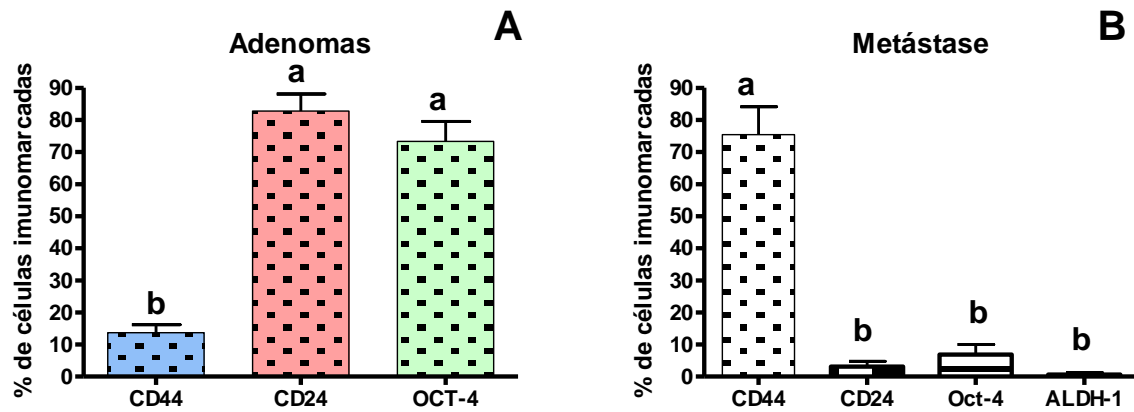


Figura 24: Porcentagem de células marcadas para os anticorpos CD44, CD24 e Oct-4 nos adenomas mamários caninos (A). Porcentagem de imunomarcção para os anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1 nas metástases mamárias caninas (B). Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Os resultados do tipo e grau histológico das metástases estão representados na tabela 4:

Tabela 4: Resultado do tipo e grau histológico dos tumores metastáticos

<i>Animal</i>	<i>Tipo Histológico</i>
1	Carcinoma mamário indiferenciado
2	Carcinoma mamário sólido III
3	Carcinoma em tumor misto grau I
4	Carcinoma mamário papilar grau II
5	Carcinoma rico em lipídios
6	Carcinoma mamário tubular grau II
7	Carcinoma mamário anaplásico
8	Carcinoma mamário tubular grau III

As imunomarcações no grupo Carcinosarcoma foram contadas nas células epiteliais e mesenquimais segundo a tabela 5. As comparações entre as porções epiteliais e mesenquimais dos anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1 não apresentaram diferenças significativas pelo teste Mann Whitney. No CD44 o valor de

p=0,6991; CD24 com p=0,2354; Oct-4, p=0,8090 e no ALDH-1 p= 0,2328. (Figuras 25 A, B, C e D)

Tabela 5: Imunomarcção em células epiteliais e mesenquimais neoplásicas de carcinossarcomas mamários caninos.

Animal	CD44		CD24		Oct-4		ALDH-1	
	E	M	E	M	E	M	E	M
<b>1</b>	60	70	30	30	90	90	0	0
<b>2</b>	77	27	10	0	60	30	5	0
<b>3</b>	50	80	30	30	30	50	7	0
<b>4</b>	50	30	30	0	70	70	40	0
<b>5</b>	30	30	0	0	50	50	0	0
<b>6</b>	33	50	0	0	80	80	0	0
<b>Médias</b>	50	47,8	16,6	10	63,3	61,6	8,6	0

E= células epiteliais neoplásicas e M= Células mesenquimais neoplásicas.

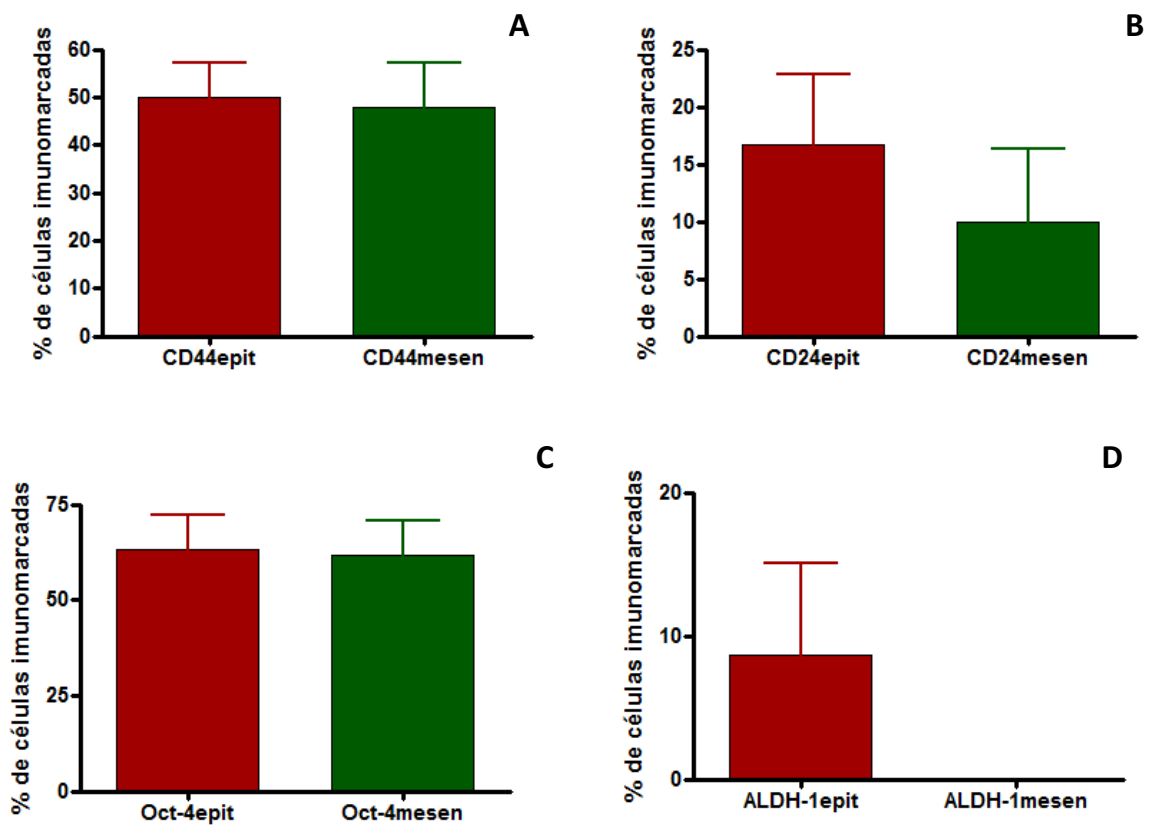


Figura 25: Porcentagem de imunomarcção para os anticorpos CD44 (A), CD24 (B), Oct-4 (C) e ALDH-1 (D) nas componentes epiteliais e mesenquimais de carcinossarcomas mamários caninos. Letras iguais não diferem pelo teste de comparação múltipla de Dunn.



## VI- DISCUSSÃO

No presente verificou-se o fenótipo imuno-histoquímico CD44+/CD24- em aproximadamente 30% das neoplasias mamárias, sendo a média de células imunomarcadas para o CD44 de 62,2%. Em cães, este fenótipo CD44+/CD24- foi observado utilizando citometria de fluxo, nas porcentagens de 91,9; 93,0; 76,2 e 44,3% em quatro diferentes linhagens celulares de neoplasias mamárias caninas (MISCHISHITA et al., 2011). As porcentagens de células marcadas por citometria de fluxo é bem parecida com a encontrada nesse estudo por imuno-histoquímica, sendo assim, a imuno-histoquímica pode ser considerada uma boa técnica para detecção de CTTs em neoplasias mamárias em cadelas. A porcentagem de células CD44+/CD24- nas culturas de neoplasias mamárias humanas têm variado significativamente. Sheridan et al. (2006) encontraram 5 linhagens celulares positivas com mais de 30% de CD44+/CD24- em um total de 13 linhagens celulares. Em outro estudo em mulheres, a detecção de CD44+/CD24- foi de aproximadamente 1% e com distribuição celular heterogênea (KAI et al., 2011). Ainda em neoplasias mamárias humanas todos os casos demonstraram porcentagens de CTTs marcadas por imuno-histoquímica variando entre 2% e 40%, sendo estas CTTs fortemente ligadas ao grau e agressividade (LORICO et al., 2011). Abraham et al. (2005) avaliou a prevalência de CD44+/CD24- nas células de neoplasias mamárias usando dupla marcação imuno-histoquímica e reportou que esse número CD44+/CD24- variou de 0 a 80%. Eles não observaram associação entre as porcentagens de CD44+/CD24- nas células tumorais com a progressão tumoral, recorrência, ou tempo livre da doença.

Das 40 neoplasias encontradas com fenótipos CD44+/CD24-, 37 eram de graus malignos como (II e III) e nas metástases. Apenas três neoplasias eram grau I. Autores encontraram mais CTTs em neoplasias mamárias humanas grau III (indiferenciados) do que no grau I (bem diferenciados), argumentando que o estabelecimento do grau da neoplasia mamária é uma das funções das CTTs (PECE et al., 2010). Graduar uma neoplasia é uma das informações mais importantes relacionadas ao tratamento para o veterinário clínico. Sem o grau histológico a comparação entre resultados se torna difícil

e praticamente impossível de obter conclusões sobre as características biológicas dos diferentes tipos de carcinomas mamários (GILBERTSON et al., 1983).

Pouco se sabe sobre a imunomarcção dessas moléculas em tecido incluído em parafina de neoplasias mamárias caninas, sendo um dos objetivos desse trabalho analisar separadamente o CD44 e CD24. Os carcinomas tubulares apresentam tendência de infiltração em tecidos adjacentes e vasos (CASSALI, 2002). No nosso estudo, o CD44 em carcinomas tubulares marcou significativamente o grau III, relacionado com pior prognóstico. O CD24 marcou mais em grau I e menos no grau II ( $p < 0,05$ ). Embora, os tipos histológicos da mulher e da cadela apresentem diversas variações, descreve-se na literatura intensa imunomarcção em carcinomas túbulos-lobulares de baixo grau em neoplasias mamárias humanas (Di BONITO et al., 2012). Salienta-se que, no presente estudo a diferença estatística apareceu entre os graus I e II para o anticorpo CD24. O que difere um grau II de um grau III normalmente são as figuras de mitoses, já que para o grau II elas ficam entre 9-16, e para o grau III elas precisam ser maiores que 17 figuras de mitoses e dez campos de grande aumento (CASSALI et al., 2011).

Nos carcinomas sólidos não observou-se o mesmo padrão de imunomarcção como dos outros tipos histológicos. Em se tratando do estudo do fenótipo CD44+/CD24-, entre 21 carcinomas sólidos, apenas três apresentaram o fenótipo positivo. Os estudos com o isolamento dos marcadores de CTTs se iniciaram em tumores sólidos mamários. Esses autores afirmaram que os tumores sólidos apresentavam uma distinta população de células com exclusiva habilidade de formar tumores em ratos. Chamando essas células de tumorigênicas ou células iniciadoras de tumores (AL-HAJJ et al., 2003). Estudos recentes têm associado à quantidade de oxigênio tecidual com a manutenção de células-tronco. O aumento do fenótipo de CTT em tumores sólidos pode estar sendo induzido pela hipóxia (LI et al., 2009). Adicionalmente a hipóxia pode regular muitos aspectos da biologia tumoral, contribuindo para proliferação da célula tumoral, resistência a agentes anti-neoplásicos, indução de angiogênese e invasão e metástase (POUYSSEGUR et al., 2006)

No entanto há evidências que o isolamento de CTTs em tumores sólidos tem sido mais difícil por diversas razões. Células em tumores sólidos são menos acessíveis e necessitam de ensaios funcionais adequados para detectar e quantificar as células-tronco normais dos órgãos que ainda estão em desenvolvimento (CLARKE et al., 2006).

Um estudo de 275 pacientes com tumores de mama de diferentes tipos e subtipos histopatológicos foram analisados com os marcadores de CD44+/CD24-, bem como, para outros marcadores (vimentina, osteonectina, conexina 43, ALDH, Citoqueratina 18, GATA3 e MUC1). O resultado foi uma grande diversidade na expressão de muitos desses marcadores nos diferentes subtipos e graus histológicos (PARK et al., 2011).

Recentemente tem sido demonstrado que somente o fenótipo CD44+/CD24- não é suficiente para caracterizar as CTTs mamárias (RAPPA et al., 2010), já que estes são considerados uma subpopulação rara dentro do tumor (BELTRAN et al., 2011).

Nosso trabalho contradiz Tai et al. (2005) embora em nosso estudo avaliou-se a expressão proteica, enquanto Tai e colaboradores avaliaram a expressão gênica. Os autores revelam que em mulheres as células epiteliais bem diferenciadas perdem a expressão gênica de Oct-4 e as células-tronco adultas humanas apresentam menor expressão do gene Oct-4 (TAI et al., 2005).

As médias de imunomarcações no anticorpo oct-4 para o grau III nos carcinomas tubular, papilar, em tumor misto foram respectivamente de 6,6; 5,2 e 5,7% (Anexo B). Esses números foram baixos, mas condizentes com a literatura, que revela que uma pequena ou rara quantidade de marcadores para CTTs existe nos tumores mais agressivos humanos (BEN-PORATH et al., 2008; HU et al., 2008). As médias de imunomarcações nos carcinomas sólido grau II e grau III foram 4,8 e 11% respectivamente. Esses números embora baixo identificam a presença desse fator de transcrição nesses carcinomas. A presença de Oct-4 está relacionada com altos graus de malignidade e condiz com pior prognóstico (BEN-PORATH et al., 2008; HU et al., 2008; LIU et al., 2011).

Autores sugerem que o grau de diferenciação tumoral, pelo menos em parte, é determinado pela atividade desses fatores de transcrição, e ainda essa atividade contribui para a agressividade e comportamento tumoral (BEN-PORATH et al., 2008). No nosso estudo, o único tipo histológico onde houve aumento significativo da imunomarcação do Oct-4 (do grau II para o grau III) foi no carcinoma sólido. Sendo assim, nosso estudo concorda com os achados de Ben-Porath et al. (2008) onde o carcinoma sólido grau III apresentou maior quantidade de imunomarcação do Oct-4, sendo provavelmente esse fator relacionado com o pior prognóstico.

Em cães, em um estudo em mamosfera, foi observada a expressão de Oct-4 somente nas células da periferia da esfera, uma possível explicação seria o fato das

células centrais já terem iniciado o processo de diferenciação (FERLETTA et al., 2011). Diferindo do nosso estudo onde as células indiferenciadas apresentaram poucas marcações enquanto as diferenciadas apresentaram intensas e em maior quantidade.

Entre as 136 neoplasias mamárias estudadas, apenas 15 (11%) foram positivas para o anticorpo ALDH-1. Nessas neoplasias positivas a quantidade de imunomarcação não ultrapassava 22%, sendo a intensidade de marcação citoplasmática acentuada em todas as neoplasias marcadas. Ainda dessas 15 positivas apenas três eram grau I, sendo 12 cadelas com tipos histológicos grau II, III, carcinossarcomas e células metastáticas. Em um estudo de neoplasias mamárias humanas, a expressão de ALDH-1, por imuno-histoquímica, no citoplasma de células epiteliais foi de 35 em um total de 245 casos (14%) (RESETKOVA et al., 2010). Neste estudo humano, os autores não encontraram correla o entre a positividade de ALDH-1 com fatores prognósticos já estabelecidos como tamanho do tumor. Autores relacionaram a expressão de ALDH-1 com tumores de alto grau, mas não estabeleceram essa molécula como um importante fator prognóstico e de metástase (GINESTIER et al., 2007). Outros estudos humanos não relacionaram a presença de ALDH1 com altos graus tumorais, metástase e resistência a quimioterápicos (MORIMOTO et al., 2009; RESETKOVA et al., 2010). Os resultados desse trabalho concordam com estudo realizado em cães, onde autores demonstraram em linhagens celulares derivadas de neoplasias mamárias caninas com capacidade de auto-renova o (CD44+/CD24-), altos níveis de ALDH-1 (MICHISHITA et al., 2012). Ressaltando que essa positividade foi verificada por citometria de fluxo e não por imuno-histoquímica como no nosso trabalho. Outros isoformes do ALDH devem ser utilizados em neoplasias mamárias caninas, já que em mulheres, o ALDH1A3 foi relacionado com a progressão do câncer de mama, além de ser indicado como marcador de CTT (MARCATO et al., 2011).

Autores afirmam que a expressão de aldeido-desidrogenase 1 (ALDH1)   considerado melhor marcador de CTTs do que o fenótipo CD44+/CD24-, quando procura selecionar uma célula-tronco dentro de um carcinoma mamário (GINESTIER et al., 2007; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010). Em nossos estudos a imunomarcação para o ALDH-1 esteve ou não presente nas neoplasias mamárias, e as que estavam presentes foram em sua maioria relacionadas ao pior prognóstico.

Tem sido demonstrado que a dissemina o metastática é o primeiro evento na progressão do câncer de mama (PANTEL & BRAKENHOFF. 2004) e se o paciente irá

desenvolver metástase depende da interação das células neoplásicas com o microambiente tumoral (PAGE et al., 1999; CHAMBERS et al., 2002; KAPLAN et al., 2006)

No nosso estudo nas comparações entre os anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1, apenas o CD44 foi altamente expressado nas células metastáticas, sendo que os outros anticorpos apresentaram raras ou ausentes marcações nessas células. Em relação ao fenótipo CD44+/CD24- das 8 metástases analisadas, 7 expressavam positividade para esse fenótipo. Estudos encontraram resultados semelhantes, mas não idênticos, pois a comparação foi entre as células neoplásicas na metástase em linfonodo com o tumor primário, sendo as células da metástase mais expressivas para o CD44+/CD24- (KAI et al., 2011). Em êmbolos linfovasculares de carcinomas inflamatórios em mulheres, autores também detectaram a expressão dos fenótipos para CTTs (XIAO et al., 2008). Na literatura relata-se que a porcentagem de marcação na metástase em linfonodo do fenótipo CD44+/CD24-, por citometria de fluxo foi de 6,1%, e esses autores afirmam que a disseminação metastática está associada com aumento desse fenótipo nas neoplasias mamárias humanas (TIEZZI et al., 2011). Normalmente quando há metástase em linfonodo, este órgão comporta-se como um reservatório para mais metástases em vasos linfáticos e posteriormente contribui para a disseminação visceral (WARD & WEISS 1989a; WARD & WEISS 1989b; SLEEMAN, 2000). Portanto é extremamente importante a compreensão do mecanismo que controla a habilidade das células malignas chegarem ao linfonodo, sua sobrevivência e crescimento nesse novo ambiente. O exato mecanismo ainda não se sabe, mas autores acreditam que essas células que conseguem chegar ao local de metástase sejam as CTTs (CHU & ALLAN, 2011). Em uma comparação entre duas culturas celulares mamárias humanas, uma (468GFP) fracamente relacionada a metástase e a outra (468LN) fortemente relacionada a metástase, houve maior expressão de CD44+/CD24- por citometria de fluxo nas células 468LN. A expressão foi de 96% do fenótipo CD44+/CD24- para as células mais agressivas (PANDIT et al., 2009). Outros estudos também relacionaram maior malignidade com a maior quantidade do fenótipo CD44+/CD24- (SHERIDAN et al., 2006).

Sabe-se que o Oct-4 é altamente expresso em células tumorais CD44+/CD24- e pode ser um potencial biomarcador para início, progressão e diferenciação de neoplasias mamárias (LIU et al., 2011). Nesse trabalho os resultados da

imunomarcção foi significativamente baixa em relação às observadas para CD44. Das oito cadelas com metástase, seis apresentaram células marcadas, sendo a média de 6,8% de células imunomarcadas para o Oct-4 nas metástases. Embora seja um número baixo, condiz com os números de imunomarcações nas neoplasias malignas encontradas nesse estudo. Concordando com estudos que descrevem pequenos números de CTTs em neoplasias (BEN-PORATH et al., 2008; HU et al., 2008).

Marcações expressivamente inversas as metástases foram obtidas nos adenomas mamários, com imunomarcações em CD44 significativamente menores do que as imunomarcações para CD24 e Oct-4. Nos adenomas também não houve imunomarcção para o ALDH-1. Em um estudo humano o CD44 foi expresso em adenomas de cólon e reto, sugerindo que o aumento dessas CTTs pode ser útil em diagnósticos precoces da doença (LEAVELL et al., 2012).

Em relação ao carcinossarcoma, esse estudo não apresentou diferenças significativas quando comparados os anticorpos CD44, CD24, Oct-4 e ALDH-1, nas porções epiteliais e mesenquimais. Porém pode-se observar que as marcações no epitélio como no mesênquima quando estavam altas nos CD44 e Oct-4, eram baixas nos CD24 e ALDH-1, e ausentes na porção mesenquimal para ALDH-1. Há observações que sugerem fortemente que os carcinossarcomas mamários humanos são derivados de uma única célula-tronco totipotente (WADA et al., 1998). Ainda, nos carcinossarcomas humanos autores sugeriram que as porções epiteliais e mesenquimais são ambas componentes do parênquima da neoplasia e também concordam com a hipótese da origem monoclonal (TEIXEIRA et al., 1998). Em medicina veterinária não há informações sobre a origem dos carcinossarcomas, mas em nosso estudo ambos os componentes epiteliais e mesenquimais apresentaram o mesmo padrão de marcação para as CTTs.

## VII – CONCLUSÕES

A reação de imuno-histoquímica revelou-se uma técnica adequada e foi padronizada para detecção de CTTs nas neoplasias mamárias caninas.

O fenótipo CD44+/CD24- foi relacionado com os graus histológicos mais agressivos e metástases. Foi pouco relacionado com tipo histológico carcinoma sólido.

Observou-se que o marcador de CTTs Oct-4 foi relacionado com um pior prognóstico apenas nos carcinomas mamários sólidos.

O marcador de CTTs ALDH-1 marcou poucas células dentro da neoplasia, e estas foram relacionadas com pior prognóstico em todos os tipos histológicos testados.

Os componentes epiteliais e mesenquimais do carcinossarcoma se comportaram com o mesmo padrão de marcação para todos os anticorpos testados.

## VIII – REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, B. K.; FRITZ, P.; McCLELLAN, M.; HAUPTVOGEL, P.; ATHELOGOU, M.; BRAUCH, H. Prevalence of CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. 1154-1159, 2005.
- AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J., CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 2003.
- AL-HAJJ, M.; CLARKE, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. **Nature oncogene**, v.23, n. 43, p.7274-7282, 2004.
- BAO, S., WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radio resistance by preferential Activation of the DNA damage response. *Nature* v. 444, n. 7120, p.756–760, 2006.
- BENJAMIN, S. A.; LEE, A. C.; SAUDERS, W. J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, n.5, p. 423-436, Set.1999.
- BEN-PORATH, I.; THOMSON, M. W.; CAREY, V. J.; GE, R., BELL, G. W.; REGEV, A.; WEINBERG, R. A. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*, v, 40, n.5, p. 499-507, 2008.
- BLACKING T. M., WILSON H., ARGYLE J. Is cancer a stem cell disease? Theory, evidence and implications. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.5, n.2, p. 76-89, 2007.
- BRODEY, R. S.; GOLDSCHIMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.19, p. 61-69, 1983.
- BUSSOLATI, A.; GRANGE, C.; SAPINO, A.; CAMUSSI, G. Endothelial cell differentiation of human breast tumor stem/progenitor cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 309-319, 2009.
- CASSALI, G. D. Patologias da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E. F.; LIMA, R. S. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 131-133, 2002.



CASSALI, G. D.; GOBBI, H.; MALM, C.; SCHMITT, F. C. Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumor: comparative features with human tumors. **Cytopathology**, v. 18, n. 3, p. 191-196, 2007.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; Magalhães, G. M.; SILVA, J. O.; Raposo, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C.; CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T.; Garrido, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C.; CAMPOS, C. B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MacDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n.8, p. 563-572, 2002.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dog with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 227, n. 10, p. 1625-1629, 2005.

CHU, J. E.; ALLAN, A.L. The role of cancer stem cells in the organ tropism of breast cancer metastasis: a mechanistic balance between the seed and the soil. *International Journal of Breast Cancer*, 2012 in press.

CLARKE, M. F.; DICK, J. E.; DIRKS, P.B.; EAVES, C. J.; JAMIESON, C. H. M.; JONES, D. L.; VISVADER, J.; WEISSMAN, I. L.; WAHL, G. M. Cancer stem cells- perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Research*, v. 66, n. 19, p. 9339-9344, 2006

COCOLA, C.; ANASTASI, P.; ASTIGIANO, S.; PISCITELLI, E.; VILARDO, L.; BERTOLI, G.; BECCAGLIA, M.; VERONESI, M.C.; SANZONE, S.; BARBIERI, O.; REINBOLD, R.A.; LUVONI, G.C.; ZUCCHI, I. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumor-initiating potential. *Reproduction in domestic animals*, v. 44 (suppl. 2), p. 214-217, 2009.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; COSTA, T.A.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. Prevalence of neoplasias and kind of treatments in dogs seen in Veterinary Hospital at University Federal of Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DEY, D.; SAXENA, M.; PARANJAPE, A.N.; KRISHNAN, V.; GIRADDI, R.; KUMAR, M.V.; MUKHERJEE, G.; RANGARAJAN, A. Phenotypic and Functional Characterization of Human Mammary Stem/Progenitor Cells in Long Term Culture. **Plos-one**, v.4, n.4, p.1-12, 2009.

DI BONITO, M.; COLLINA, F.; CANTILE, M.; CAMERLINGO, R.; CERRONE, M.; MARRA, L.; LIGUORI, G.; PIROZZI, G.; BOTTI, G. Aberrant Expression of Cancer Stem Cells Marker Prominin-1 in Low-Grade Tubulobular Breast Carcinoma: A Correlative Study between qRT-PCR, Flow-Cytometric and Immunohistochemistry Analysis. **Journal of Breast Cancer**, v.15, n. 1, p. 15-23, 2012.

DIEHN M., et al. Association of reactive oxygen species levels and radio resistance. In cancer stem cells. **Nature** v.458, p.780–783, 2009.

DU, L.; WANG, H.; HE, L.; ZHANG, J.; NI, B.; WANG, X.; JIN, H.; CAHUZAC, N.; MEHRPOUR, M.; LU, Y.; CHEN, Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6751–6760, 2008.

EIREW, P.; KANNAN, N.; KNAPP, D. J.; VAILLANT, F.; EMERMAN, J. T.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E.; EAVES, C. J. Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells. **Stem Cells**, v.30, n. 2, p. 344-348, 2012.

FERLETTA, M., GRAWÉ, J., HELLMÉN, E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature **The international Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 7-9, p. 791-799, 2011.

FIALKOW, P.J. Clonal origin of human tumors, **Annals Reviews of Medicine**, v.30, p. 135-143, 1979.

FIALKOW, P.J.; JACOBSON, R.J.; SINGER, J.W.; SACHER, R.A.; MCGUFFIN, R.W.; NEEFE, J.R. Philadelphia Chromosome (Ph1)- Negative Myelogenous Leukemia (CML): A clonal disease with origin in a multipotent Stem Cell. **Blood**, v. 56, n.1, p. 70-73, 1980.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary Carcinomas with clinical implications: application. Of the human classification. **Virchows Archive Pathology**, v. 453, n. 2, p. 123–132, 2008.

GÄRTNER, F.; GERALDES, M.; CASSALI, G.; REMA, A.; SCHMITT, F. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal

cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. **The Veterinary Journal**, v. 158, n. 1, p. 39-47, 1999.

GILBERTSON, S. R.; KURZMAN, I. D.; ZACHRAU, R. E.; HURVITZ, A. I.; BLACK, M. M. Canine mammary epithelial neoplasms: biologic implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 2, p. 127-142, 1983.

GINESTIER, C.; HUR, M. H.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; MONVILLE, F. DUTCHER, J.; BROWN, M.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; KLEER, C.; LIU, S.; SCHOTT, A.; HAYES, D; BIRNBAUM, D.; WICHA, M. S.; DONTU, G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell**, v.11, n. 5, p. 555–567, 2007.

GREENOW, K., CLARKE, R. Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: The role of pluripotency pathways. **Physiological Reviews**, v.92, p.75-99, 2012.

HAMPE JF, MISDORP W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of World Health Organization**. v. 50, p. 111-133, 1974.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A. A. Comparative study of peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 75, p. 734-738, 1981.

HU, T.; LIU, S.; BREITER, D.R.; WANG, F.; TANG, Y.; SUN, S. Octamer 4 Small Interfering RNA results in cancer stem cell–like cell apoptosis. **Cancer Research**, v. 68, n. 16, p. 6533-6540, 2008.

KAI, K.; ARIMA, Y.; KAMIYA, T.; SAYA, H. Breast Cancer Stem Cells. **Breast Cancer**, v.17, n.2, p. 80-85, 2010.

KAPLAN, R. N.; RAFII, S.; LYDEN, D. Preparing the 'soil': the premetastatic niche. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 1089-11093, 2006.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Histological Grading and Prognosis in Dog with Mammary Carcinomas: Application of a Human Grading Method. **Journal Comparative Pathology**, v. 133, n. 4, p. 246-252, 2005.

KAY, R., TAKEI, F.; HUMPHRIES, R. K. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. **The Journal of Immunology**, v.145, n. 6, p. 1952-1959, 1990.

KAI, K., ARIMA, Y., KAMIYA, T., SAYA, H. Breast cancer stem cells. **Breast Cancer**, v. 17, n. 2, p. 80-85, 2010.

KAI, M., ONISHI, H., SOUZAKI, M., TANAKA, H., KUBO, M., TANAKA, M., KATANO, M. Semi-quantitative evaluation of CD44+/CD24- tumor cell distribution in breast cancer tissue using a newly developed fluorescence immunohistochemical staining method. **Cancer Science**, v. 102, n. 12, p. 2132-3138, 2011.

KRISTIANSEN, G., SAMMAR, M., ALTEVOGT, P. Tumour Biological Aspects of CD24, A Mucin-Like Adhesion Molecule. **JOURNAL OF MOLECULAR HISTOLOGY**, v. 35, n. 3, p. 255-262, 2004.

KUMARAGURUPARAN, R.; PRATHIBA, D.; NAGINI, S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. **Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 218-224, 2006.

KUNJU, L. P.; TOY, K.; THOMAS, D.; DING, Y.; KLEER, C. G. Expression of the stem cell markers ALDH1 and EZH2 in triple negative invasive breast carcinomas. In: *Laboratory Investigation*, v. 89, suppl. 1, p. 52A, 2009.

LAS MULAS J. M.; MILLA, N. Y.; DIOS, R. A. Prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor a and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 200-212, 2005.

LI, Z.; BAO, S.; WU, Q.; WANG, H.; EYLER, C.; SATHORNSUMETEE, S.; SHI, Q.; CAO, Y.; LATHIA, J.; MCLENDON, R. E.; HJELMELAND, A. B.; RICH, J. N. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. **Cancer Cell**, v. 15, n. 6, p. 501–513, 2009.

LI, J.; ZHOU, B. P. Activation of  $\beta$ -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. **BMC Cancer**, v.11, n.49, 2011.

LIU, H.; PATEL, M. R.; PRESCHER, J. A.; PATSIALOU, A.; QIAN, D.; LIN, J.; WEN, S.; CHANG, Y. F.; BACHMANN, M. H.; SHIMONO, Y.; DALERBA, P.; ADORNO, M.; LOBO, N.; BUENO, J.; DIRBAS, F.M.; GOSWAMI, S.; SOMLO, G.; CONDEELIS, J.; CONTAG, C. H.; GAMBHIR, S. S.; CLARKE, M. F. Cancer stem cells from human breast

tumors are Involved in spontaneous metastases in Orthotopic mouse models. **PNAS**, v.107, n. 42, p. 18115-18120, 2010.

LIU, C. G., LU, Y., WANG, B. B., ZHANG, Y. J., ZHANG, R. S., LU, Y., CHEN, B., XU, H., JIN, F., LU, P. Clinical implications of stem cell gene Oct-4 expression in breast cancer. **Annals of Surgery**, v. 253, n. 6, p. 1165-1171, 2011.

LORICO, A.; RAPPA, G. Phenotypic heterogeneity of breast cancer stem cells. **Journal of Oncology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

LOUDERBOUGH, J. M.V., BROWN, J.A., NAGLE, R.B., SCHROEDER, J.A. CD44 Promotes Epithelial Mammary Gland Development and Exhibits Altered Localization during Cancer Progression. **Genes & Cancer**, v. 2 n.8, p. 771-781, 2011.

MAcEWEN, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer and treatment. **Cancer Metastase Reviews**, v.9, n. 2, p.125-36, Sep. 1990.

MARCATO, P.; DEAN, C.A.; PAN, D.; ARASLANOVA, R.; GILLIS, M.; JOSHI, M.; HELYER, L.; PAN, L.; LEIDAL, A.; GUJAR, S.; GIACOMANTONIO, C. A.; LEE, P. W. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. **Stem Cells**, v. 29, n.1, p. 32-45, 2011.

MISDORP, W.; COTCHIN, E.; HAMPE, J. F.; JABARA, A. G.; VON SANDERSLEBEN, J. Canine malignant mammary tumors III. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Veterinary Pathology**, v. 10, p.10, 241–256, May. 1973.

MISDORP, H.; ELSE, R.; HELLMAN, E.. Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: **World Health Organization** Internacional Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Series 2, v. 7, n° 2, Armed Forces Institute of Pathology Washington DC, 1999.

MICHISHITA, M., AKIYOSHI, R., YOSHIMURA, H., KATSUMOTO, T., ICHIKAWA, H., OHKUSU-TSUKADA, K., NAKAGAWA, T., SASAKI, N., TAKAHASHI, K. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 254-260, 2011.

MICHISHITA, M.; AKIYOSHI, R.; SUEMIZU, H.; NAKAGAWA, T.; SASAKI, N.; TAKEMITSU, H.; ARAI, T.; TAKAHASHI, K. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer

stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. *The Veterinary Journal*, 2012. In press.

MOTTOLES, E. M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCIARRETTA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, P.G. Spontaneous canine mammary tumors: A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer. **Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology**, v.71, p.182-87, 1994.

MOREL, A-P., LIEVRE, M., THOMAS, C., HINKAL, G., ANSIEAU, S., PUISIEUX, A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. **Plos-one**, v. 3, n.8, 2008.

MOULTON, J. E. Tumors of the mammary gland. In: **Tumors in Domestic Animals**. Berkeley: University of California Press, ed.3, p. 518-552, 1990.

MUZIO, G.; MAGGIORA, M.; PAIUZZI, E.; ORALDI, M.; CANUTO, R. A. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 15;52, n. 4, p. 735-746, 2012.

NAOR, D.; WALLACH-DAYAN, S. B.; ZAHALKA, M. A.; SIONOV, R. V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 4, p. 260–267, 2008.

OLIVEIRA FILHO, J.C.; KOMMERS, G.D.; MASUDA, E.K.; MARQUES, B.M.F.P.P., FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 2, p. 177-185, 2010.

ORAVECZ-WILSON, K. I.; PHILIPS, S. T.; YILMAZ, O. H.; AMES, H. M.; LI, L.; CRAWFORD, B. D.; GAUVIN, A. M.; LUCAS, P. C.; SITWALA, K.; DOWNING, J. R.; MORRISON, S. J.; ROSS, T. S. Persistence of leukemia-initiating cells in a conditional Knockin model of an imatinib-responsive myeloproliferative disorder. **Cancer Cell** v.16, p.137–148, 2009.

PAGE, D. L.; ANDERSON, T. J.; CARTER, B. A. Minimal solid tumor involvement of regional and distant sites: When is a metastasis not a metastasis? **Cancer**, v. 86, n. 12, p. 2589-2592, Sep. 1999.

PANDIT, T.S., KENNETTE, W., MACKENZIE, L., ZHANG, G., AL-KATIB, W., ANDREWS, J., VANTYGHM, S.A., ORMOND, D.G., ALLAN, A.L., RODENHISER, D.I., CHAMBERS, A.F., TUCK, A.B. Lymphatic metastasis of breast cancer cells is associated with differential gene expression profiles that predict cancer stem cell-like

properties and the ability to survive, establish and grow in a foreign environment. **International Journal of Oncology**, v.35, n.2, p.297-308, 2009.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 380-391, 2009.

PARK, S. Y.; LEE, H. E.; LI, H.; SHIPITSIN, M.; GELMAN, R.; POLYAK, K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. 876-887, 2010.

PECE, S., TOSONI, D., CONFALONIERI, S., MAZZAROL, G., VECCHI, M., RONZONI, S., BERNARD, L., VIALE, G., PELICCI, P.G., DI FIORE, P.P. Biological and Molecular Heterogeneity of Breast Cancers Correlates with Their Cancer Stem Cell Content. **Cell**, v. 140 p. 62–73, 2010.

PETERSEN, O.W., POLYAK, K. Stem cells in the human breast. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.2, n.5, p. 1-15, 2010.

PHILIBERT, J. C.; SNYDER, P. W.; GLICKMAN, N.; GLICKMAN, L. T.; KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 102-106, 2003.

PHILLIPS, Y. M.; MCBRIDE, W. H.; PAJONK, F. The Response of CD24-/ CD44+, Breast Cancer – Initiating Cells to Radiation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 24, p. 1777-1785, 2006.

PONCET, C.; FRANCES, V.; GRISTINA, R.; SCHEINER, C.; PELLISSIER, J. F.; FIGARELLA-BRANGER, D. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. **Acta Neuropathology**, v. 91, n. 4, p. 400-408, 1996.

PONTI, D.; COSTA, A.; ZAFFARONI, N.; PRATESI, G.; PETRANGOLINI, G.; CORADINI, D.; PILOTTI, S.; PIEROTTI, M. A.; DAIDONE, M. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. **Cancer Research**, v.65, n. 13, p. 5506-11, 2005.

POUYSSSEGUR, J.; DAYAN, F. MAZURE, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumor regression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 437–443, 2006.

RAPPA, G.; LORICO, A. Phenotypic characterization of mammosphere forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 9, p. 1576-1586, 2010.

SCHAFFER, K. A.; KELLY, G.; SCHRADER, R.; GRIFFITH, W. C.; MUGGENBURG, B. A.; TIERNEY, L.A.; LECHINER, J. F.; JANOVITZ, E. B.; HAHN, F.F. A canine model of familial mammary gland neoplasia. **Veterinary Pathology**, v.35, n. 3, p.168-77, 1998.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n. 2, p.419-26, 1970.

SHAFEE N., SMITH C. R., WEI S., KIM Y., MILLS G. B., HORTOBAGYI G. N., STANBRIDGE E.J., LEE E. Y-H. P. Cancer Stem Cells Contribute to Cisplatin Resistance in Brca1/p53– Mediated Mouse Mammary Tumors. **Cancer Research**, v. 68, n.9, p. 3243-3250, 2008.

SHERIDAN, C.; LISHIMOTO, H.; FUCHS, R. K.; MEHROTRA, S.; BHAT-NAKSHATRI, P.; TURNER, C. H.; GOULET JUNIOR, R.; BADVE, S.; NAKSHATRI, H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2006.

SHIRASAWA, T., AKASHI, T., SAKAMOTO, K., TAKAHASHI, H., MARUYAMA, N., HIROKAWA K. Gene Expression of CD24 Core Peptide Molecule in Developing Brain and Developing Non-Neural Tissues. **DEVELOPMENTAL DYNAMICS** 1981-13, 1993.

SLEEMAN, J. P. The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. **Recent Results Cancer Research**, v. 157, p. 55-81, 2000.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.

TAI, M-H., CHANG, C-C., OLSON, L.K., TROSKO, J.E. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.26, n.2, p.495--502, 2005.

TANEI, T., MORIMOTO, K., SHIMAZU, K., JIN KIM, S., TANJI, Y., TAGUCHI, T., TAMAKI, Y., NOGUCHI, S. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. **Clinical Cancer Research**, v.15,p.v4234-4241, 2009.



TEIXEIRA, M. R.; QVIST, H.; BØHLER, P. J.; PANDIS, N.; HEIM, S. Cytogenetic Analysis Shows That Carcinosarcomas of the Breast Are of Monoclonal Origin. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 22, n. 2, p. 145–151, 1998.

TIEZZI, D.G., VALEJO, F.A.M., MARANA, H.R.C., CARRARA, H.H.A., BENEVIDES, A., ANTONIO, H.M.R., SICCHIERI, R.D., MILANEZI, C.M., SILVA, J.S., ANDRADE, J.M. CD44+/CD24- cells and lymph node metastasis in stage I and II invasive ductal carcinoma of the breast. **Medical Oncology**, 2011

TROSKO J. E., Review Paper: Cancer Stem Cells and Cancer Nonstem Cells: From Adult Stem Cells or Reprogramming of Differentiated Somatic Cells. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 176-193, 2009.

UVA, P.; AURISICCHIO, L.; WATTERS, J.; LOBODA, A.; KULKARNI, A.; CASTLE, J.; PALOMBO, F.; VITI, V.; MESITI, G.; ZAPPULLI, V.; MARCONATO, L.; ABRAMO, F.; CILIBERTO, G.; LAHM, A.; LA MONICA, N.; AND RINALDIS, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v. 10, n.135, 2009.

VELASCO-VELASQUEZ, M.A., HOMSI, N., DE LA FUENTE, M., PESTELL, R.G. Breast cancer stem cells. **The international Journal of Biochemistry and cell biology**, v.44, p. 573-577, 2012.

XIAO, Y., YE, Y., YEARSLEY, K., JONES, S., BARSKY, S.H. The Lymphovascular Embolus of Inflammatory Breast Cancer Expresses a Stem Cell-Like Phenotype. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, 2008

ZIELSKE, S.P., SPALDING, A.C., WICHA, M.S., LAWRENCE, T.S. Ablation of Breast Cancer Stem Cells with Radiation. **Translational Oncology**, v. 4, p. 227–233, 2011.

ZUCCHI I., SANZONE S., ASTIGIANO S., PELUCCHI P., SCOTTI M., VALSECCHI V., BARBIERI O., BERTOLI G., ALBERTINI A., REINBOLD A., DULBECCO D. R. The properties of a mammary gland cancer stem cell. **Proceeding of the Nacional Academy of Science**, v.104, n.25, p. 10476-10481, 2007.

ZUCCHI, I.; ASTIGIANO, S.; BERTALOT, G.; SANZONE, S.; COCOLA, C.; PELUCCHI, P.; BERTOLI, A.G.; STEHLING, A.M.; BARBIERI, O.; ALBERTINI, A.; SCHOLERD, H.R.; NEEL, B.G.; REINBOLD, R.A.; DULBECCO, R. Distinct populations of tumor-initiating cells derived from a tumor generated by rat mammary

cancer Stem cells. **Proceeding of the Nacional Academy of Science**, v.105, n.44, p. 16940-16945, 2008.

WARD, P. M.; WEISS L. Metachronous seeding of lymph node metastases in rats bearing the MT-100-TC mammary carcinoma: the effect of elective lymph node dissection. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 14, n.3, p. 315-320, 1989a.

WARD P. M.; WEISS, L. The relationship between lymphogenous and hematogenous metastasis in rats bearing the MT-100-TC mammary carcinoma. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 7, n. 3, p. 253-264, 1989b.

WIDAKOWICH, C., AZAMBUJA, E., GIL, T., CARDOSO, F., DINH, P., AWADA, A., et al. Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1375-1387, 2007.

## ANEXOS

Anexo A – Características utilizadas para classificação dos tumores mamários das cadelas conforme o grau de malignidade.

<b>Características</b>	<b>Escores</b>
1. <i>Formação de túbulo</i> : um ponto para formação de túbulos bem marcada; três pontos para pouco ou nenhum túbulo	1 2 3
2. <i>Hipercromatismo e mitoses</i> : um ponto se uma figura mitótica é vista ocasionalmente; dois pontos se duas ou três figuras são vistas; três pontos se o número é alto	1 2 3
3. <i>Tamanho e forma irregular do núcleo</i> : um ponto se os núcleos são proporcionais em tamanho e forma, três pontos quando o pleomorfismo é marcado	1 2 3
<b>Total do escore</b>	<b>Grau de malignidade</b>
<b>3-5</b>	<b>I</b>
<b>6-7</b>	<b>II</b>
<b>8-9</b>	<b>III</b>

Fonte: Misdorp et al., 1999

**Anexo B** – Médias percentuais e erro-padrão das médias das células imunomarcadas pelo teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney nos grupos 1 a 11, e nos 13 e 14.

<i>Grupos</i>	<i>CD44</i>	<i>CD24</i>	<i>Oct-4</i>	<i>ALDH-1</i>
Tub1	32,7 ± 6,5	18,7 ± 16,9	37,0 ± 4,3	0,8 ± 0,8
Tub2	46,8 ± 3,1	5,0 ± 5,6	37,5 ± 5,0	1,6 ± 0,9
Tub3	57,5 ± 5,4	9,0 ± 12,8	6,6 ± 2,8	0,5 ± 0,5
Pap1	35,4 ± 5,3	15,0 ± 2,9	13,8 ± 4,3	0 ± 0
Pap2	36,5 ± 7,3	11,2 ± 3,7	7,5 ± 2,1	0,2 ± 0
Pap3	46,2 ± 5,2	10 ± 10	5,0 ± 2,6	0 ± 0
Sol2	36,8 ± 6,0	5,4 ± 2,7	4,8 ± 1,6	4,1 ± 6,7
Sol3	36,1 ± 11,4	8,5 ± 4,0	11,0 ± 2,0	0 ± 0
Misto1	46,3 ± 7,2	29,2 ± 8,1	16,5 ± 4,3	1,4 ± 2,3
Misto2	50,1 ± 5,9	20,0 ± 7,6	16,8 ± 3,9	0 ± 0
Misto3	47,2 ± 3,9	15,0 ± 7,3	5,7 ± 1,5	0 ± 0
Met	75,3 ± 8,7	3,1 ± 1,6	6,8 ± 3,1	0,6 ± 0,6
Adeno	13,6 ± 2,5	82,7 ± 5,3	73,3 ± 6,2	0 ± 0