

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
TUMORAIS NAS NEOPLASIAS DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA EM CADELAS**

**Gabriela Mayumi Gouveia**

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
TUMORAIS NAS NEOPLASIAS DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA EM CADELAS**

**Gabriela Mayumi Gouveia**

**Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

**ARAÇATUBA – SP**

**2012**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**GABRIELA MAYUMI GOUVEIA** – nascida em São Paulo em 15 de agosto de 1985. Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Metodista de São Paulo onde fui bolsista PIBIC com o trabalho intitulado “Quantificação de AgNORs como procedimento complementar na avaliação citopatológica de formações mamárias de cães”, além de integrar o grupo de discentes participantes do diretório acadêmico da universidade, organizando cursos e eventos na mesma tendo graduado em 2009. Em 2010 ingressei na Universidade Estadual Paulista-Campus Araçatuba, sendo bolsista CNPQ para a obtenção do título de mestrado em Ciência Animal.

Aprendi o silêncio com os faladores, a tolerância com os intolerantes, a  
bondade com os maldosos; e, por estranho que pareça, sou grato a esses  
professores.  
**Khalil Gibran**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero agradecer à minha orientadora, professora Maria Cecília, que me deu a chance de realizar esse mestrado, me ajudando e ensinando não apenas com assuntos relacionados à dissertação, mas também com tudo ao que se refere à vida acadêmica.

Gostaria também de agradecer ao CNPQ que concedeu a bolsa de mestrado que foi de grande valia para a conclusão deste projeto.

Agradeço imensamente aos meus pais e a minha família, que apesar de estarem longe durante esses dois anos, sempre me deram forças e incentivo para continuar. Amo muito vocês.

Para a realização do trabalho, tive ajuda e colaboração de pessoas que foram essenciais nessa jornada. Sou muito grata à professora Sandra que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, me ensinou e me incentivou mesmo em momentos de dificuldades.

À professora Gisele, muito obrigada pelas dicas, pela paciência, e principalmente pela compaixão e amor que sempre mostrou pelos “bichanos”. Graças a sua bondade pude conhecer meus amores.

À professora Flávia gostaria de agradecer pela oportunidade de coletar meu material junto a sua equipe nas cirurgias.

Um agradecimento especial às pessoas da FMABC, principalmente ao professor Caio, à professora Bianca e à mestranda Fernanda, que graças ao trabalho maravilhoso que conduzem (FAPESP 2010/01431-7), pude realizar parte importante da minha dissertação.

Gostaria de agradecer aos amigos que tive oportunidade de fazer no departamento de ciências básicas, Ariane, Jean, Alisson, Daniel e Grazi, pela ajuda, pelos desabafos, pela paciência e por tornar meus dias na odonto sempre melhores.

Aos colegas e amigos que fiz durante esses anos em Araçatuba muito obrigada por tudo. Em especial, Milla, que se tornou amiga de coração e

confidente de todas as horas, e também Murilo (Fud's), Renan, Leticia, Luiz e Dani, sem vocês esses dois anos de mestrado teriam sido muito sem graça.

Agradeço também aos meus amores, companheiros de todas as horas Dingo e Breuba, por serem gatinhos muito especiais e pelo amor incondicional demonstrado.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus irmãos de coração, Mel, Lincoln, Robson e Fernanda, pois mesmo estando em cidades diferentes sempre me fizeram manter o ritmo.

## SUMÁRIO

|                                                                                 | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                             | 14     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                  | 19     |
| 2.1. A Glândula Mamária de Cadelas .....                                        | 20     |
| 2.2. Neoplasias da Glândula Mamária de Cadelas .....                            | 21     |
| 2.3. Células Tronco Tumoraes .....                                              | 23     |
| 2.4. Proteína de Células Tronco .....                                           | 27     |
| 2.5. Transição Epitelial-Mesenquimal .....                                      | 28     |
| 2.6. Cultivo Celular .....                                                      | 29     |
| 2.7. Telomerase .....                                                           | 30     |
| 3. OBJETIVOS .....                                                              | 33     |
| 3.1. Objetivo Geral .....                                                       | 34     |
| 3.2. Objetivos Específicos .....                                                | 34     |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                    | 35     |
| 4.1. Amostras .....                                                             | 36     |
| 4.2. Preparo das Lâminas de <i>Tissue MicroArrays</i> .....                     | 36     |
| 4.3. Imuno-Histoquímica dos TMAs .....                                          | 38     |
| 4.4. Quantificação da Imunomarcagem .....                                       | 40     |
| 4.5. Análise Estatística dos TMAs .....                                         | 40     |
| 4.6. Preparação dos Meios de Cultura .....                                      | 40     |
| 4.6.1 RPMI Suplementado .....                                                   | 40     |
| 4.6.2 Meio de Congelamento .....                                                | 41     |
| 4.7. Cultura Primária .....                                                     | 41     |
| 4.8. Repique das Células .....                                                  | 43     |
| 4.9. Imuno-histoquímica dos Cultivos Celulares .....                            | 44     |
| 4.10. Extração de RNA .....                                                     | 44     |
| 4.11. Diluição das Amostras .....                                               | 45     |
| 4.12. Síntese de cDNA .....                                                     | 46     |
| 4.13. PCR em Tempo Real .....                                                   | 46     |
| 4.13.1. Análise estatística da PCR .....                                        | 47     |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                 | 48     |
| 5.1. Análise Anatomopatológica .....                                            | 49     |
| 5.1.1. Análise anatomopatológica dos tumores utilizados<br>para o cultivo ..... | 52     |
| 5.2. Análise Imuno-histoquímica dos TMAs .....                                  | 53     |
| 5.2.1. Citoqueratina e Vimentina .....                                          | 53     |
| 5.2.2. Anticorpo CD44 .....                                                     | 54     |
| 5.2.2.1. Neoplasias Mamárias Benignas .....                                     | 56     |
| 5.2.2.2. Neoplasias Mamárias Malignas .....                                     | 57     |
| 5.3. Cultivo Celular .....                                                      | 58     |
| 5.3.1. Análise Imuno-histoquímica dos Cultivos Celulares ...                    | 60     |
| 5.3.1.1. Análise das Neoplasias que<br>Originaram os cultivos.....              | 61     |

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.1.2. Análise das Citoinclusões das PAAF's .....                             | 62 |
| 5.3.1.3. Análise Morfológica e Imunocitoquímica das Células<br>Cultivadas ..... | 65 |
| 5.4. Expressão da Telomerase .....                                              | 68 |
| 6. CONCLUSÕES .....                                                             | 69 |
| REFERÊNCIAS .....                                                               | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                    |                                                                          |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| ALDH               | Aldeído desidrogenase                                                    |
| cDNA               | DNA complementar                                                         |
| CTT                | Célula tronco tumoral                                                    |
| DAB                | Diaminobenzidina                                                         |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido                                                         |
| DNA                | Ácido desoxirribonucleico                                                |
| EMT                | Transição epitelial-mesenquimal                                          |
| LSAB               | <i>Labeled streptavidin biotin</i>                                       |
| MEGS               | <i>Mammary epithelial growth supplement</i>                              |
| mRNA               | RNA mensageiro                                                           |
| OMS                | Organização Mundial de Saúde                                             |
| OSH                | Ovariohisterectomia                                                      |
| PAAF               | Punção aspirativa por agulha fina                                        |
| pb                 | pares de base                                                            |
| PBS                | <i>Phosphate buffer saline</i>                                           |
| PCR                | Reação em cadeia da polimerase                                           |
| qRT-PCR            | PCR em tempo real                                                        |
| RNA                | Ácido ribonucleico                                                       |
| RNAse              | Enzima que rompe a fita de RNA                                           |
| RPM                | Rotações por minuto                                                      |
| TDLU               | Unidade ductal tubular                                                   |
| TERC               | RNA modelo para telomerase                                               |
| TERT<br>telomerase | Subunidade de transcriptase reversa catalítica que codifica a telomerase |
| TMA                | <i>Tissue micro array</i>                                                |
| SRD                | Sem raça definida                                                        |

## AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS NAS NEOPLASIAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM CADELAS

**RESUMO** - Os tumores mamários são as mais freqüentes neoplasias em cadelas, representando cerca de 50% dos tumores diagnosticadas nesta espécie e tem maior incidência em fêmeas de meia idade a idosas. Têm sido utilizadas como modelo de estudo para neoplasias mamárias de mulher devido às várias características comuns como as similaridades histológicas e imuno-histoquímicas. Na última década, estudos baseados nos perfis moleculares das neoplasias mamárias, tornaram possível a identificação de algumas células neoplásicas com características de células tronco – as células tronco tumorais (CTT). Uma das moléculas putativas para marcação das CTTs é o CD44. A telomerase, que vem sendo relatada como marcador tumoral, é potencialmente expressa também em CTTs. Estudos recentes estabeleceram um elo crucial entre a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a aquisição de propriedades moleculares e funcionais de células-tronco. Por este motivo analisamos a expressão das proteínas CD44, Citoqueratinas AE1/AE3 e Vimentina, e da enzima telomerase, em tumores mamários de cadelas a fim de investigar o potencial de marcação de CTTs e sua relação com a EMT. Para tal foram utilizados métodos de imuno-histoquímica em tecidos parafinizados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, fazendo-se uso de técnicas como Tissue MicroArrays (TMA), citoinclusão de tecidos tumorais e cultivos celulares. A expressão da telomerase nas células de tumores mamários cultivadas foi analisada por PCR em tempo real. Nas amostras de tecido parafinado *in vivo*, a imunomarcação da citoqueratina demonstrou diferença significativa entre tumores benignos e malignos ( $p < 0,05$ ), mostrando-se mais intensa em tumores malignos. Já a vimentina apresentou maior intensidade de marcação em tumores benignos, porém não apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ). A expressão do CD44 foi maior em tumores malignos que possuem maior potencial proliferativo e metastático, porém não foi detectada relação com a EMT, nos tumores

analisados. Foi observada expressão da telomerase nas células neoplásicas cultivadas, porém sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao tecido mamário normal. As técnicas para a montagem dos TMAs e de cultivo celular foram eficientes, podendo ser utilizadas na rotina e em pesquisas posteriores.

**Palavras-chave:** Antígenos CD44, culturas e meios de cultura, imuno-histoquímica, neoplasia mamária-cão, reação em cadeia da polimerase.

## EVALUATION OF CANCER STEM CELLS POPULATION IN NEOPLASIAS OF BITCHES MAMMARY GLAND

**SUMMARY** – Mammary tumors are the most frequent cancers in dogs, representing about 50% of tumors, and have a higher incidence in females of middle aged and elderly. These tumors have been used as a model for breast cancer in women due to several common characteristics such as histological and immunohistochemical similarities. In the last decade, studies based on molecular profiles of breast cancer, made possible the identification of some neoplastic cells with characteristics of stem cells – cancer stem cells (CSC). One of the putative molecules of CSCs is CD44. Telomerase, which has been reported as a tumor marker, is potentially also expressed in CSCs. Recent studies have established a crucial link between the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the acquisition of molecular and functional properties of stem cells. For that reason we analyzed the expression of proteins CD44, Cytokeratins AE1/AE3 and Vimentin, and the telomerase enzyme, in dogs mammary tumors, to investigate the potencial for CSC markers, and its relation with the EMT using immunohistochemistry in paraffin embedded tissues in both *in vivo* and *in vitro*, making use of techniques such as Tissue MicroArrays (TMA), cell blocks from tumors and cell cultures. Besides that, we analyzed the telomerase expression in mammary tumor cultivated cells by quantitative real time PCR. Immunostaining of cytokeratin had no significant difference between benign and malignant tumors ( $p < 0,05$ ), being more intense in malignant tumors. However vimentina showed higher staining intensity in benign tumors, but with no significant difference ( $p < 0,05$ ). The expression of CD44 was higher in malignant tumors that have greater proliferative and metastatic potencial, however its relation with EMT was not detected in the analyzed tumors. Telomerase expression was positive in the neoplastic cultivated cells, however without significant difference ( $p < 0,05$ ) compared to normal mammary tissue. The techniques applied were efficient and can be used in routine and later researches.

**Keywords:** antigens CD44, cell culture techniques, breast neoplasms-dog, Immunohistochemistry, polymerase chain reaction.

---

## INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

Os tumores mamários são as mais frequentes neoplasias em cadelas (BOSTOCK, 1986), compondo numerosas variantes entre benignos e malignos (MISDORP et al. 1999). Representam cerca de 50% dos tumores observados em cadelas e tem maior incidência em fêmeas de meia idade a idosas (DALECK et al. 1998; MARTINS et al. 2002). A espécie canina, de fato, é a que apresenta espontaneamente, a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais tumores mamários que a mulher (BRODEY et al. 1983).

A disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor algumas características biológicas das neoplasias, o que proporciona uma avaliação de prognóstico, diagnóstico e tratamento (MOTTOLESE et al., 1994). Um importante desafio à pesquisa do câncer é entender como alterações genéticas associadas à tumorigênese contribuem para as alterações celulares e biológicas que podem ser reconhecidas como malignas. (RICARDO et al. 2011).

A proliferação celular é controlada por sinais do microambiente que podem ser tanto inibidores como estimulatórios. Porém a patogênese molecular de invasão e metástase dos tumores de mama ainda é pouco conhecida. Recentemente foram realizados estudos em tumores mamários em mulheres, com o objetivo de identificar e entender as moléculas expressas pelas células tumorais, que foram realizados através de análise imuno-histoquímica utilizando anticorpos relacionados a metástases e proliferação celular, foram associados às células com características de células tronco. (ALI et al. 2011; WU et al. 2011) Na última década, tratamentos clínicos foram desenvolvidos baseados nos perfis moleculares das células tumorais mamárias. Assim, a terapia mais promissora teve origem na identificação de determinadas células

neoplásicas com as características de células tronco, denominadas células tronco tumorais (CTT) (RICARDO et al. 2011).

Uma das moléculas envolvidas na marcação das CTTs é o CD44 (GOODISON, TARIN, 1998; PALTIAN et al. 2009), e a sua expressão alterada já foi relatada em diversas neoplasias (SNEATH, MANGHAM, 1998; HERRERA-GAYOL, JOTHY, 1999). Baseado em estudos recentes, existem evidências que sustentam a idéia de que o CD44 juntamente com o CD24, que são marcadores de membrana celular, em combinação com o aldeído desidrogenase (ALDH), seriam os mais precisos para a identificação e isolamento das CTTs em tumores mamários, porém existem muitas discrepâncias entre os resultados (GINESTIER et al. 2007). Por este motivo, torna-se imperativo identificar mais precisamente as CTTs, principalmente em tecidos caninos, para maior compreensão das mesmas nas neoplasias mamárias (RICARDO et al. 2011).

A senescência celular está ligada ao encurtamento dos telômeros, que são complexos de nucleoproteínas especializadas, localizadas nas extremidades finais dos cromossomos (PANG, ARGYLE, 2009). A cada divisão celular ocorre uma alteração ao final da replicação, pela incapacidade da DNA polimerase de replicar o final 5' dos cromossomos lineares, perdendo assim de 50 a 200 pares de base de DNA telomérico (ARGYLE, NASIR, 2003; YAZAWA et al. 1999). A imortalização celular é um evento importante para a progressão tumoral, e pode ser adquirida pela manutenção dos telômeros. Um melhor entendimento do processo de imortalização das células neoplásicas e como ele está relacionado as CTTs pode identificar alvos moleculares a fim de gerar novos tratamentos e prevenção do câncer (PANG, ARGYLE, 2009). É conhecido que a telomerase, uma ribonucleoproteína, age como uma transcriptase reversa catalisando novas sequências teloméricas no fim dos cromossomos, e a sua expressão já foi observada em células tronco adultas em humanos (HIYAMA et al. 1995). Estudos baseados na expressão da telomerase em oncologia veterinária são importantes para o maior conhecimento na oncologia comparada (ARGYLE, NASIR, 2003).

Estudos recentes estabeleceram ainda um elo crucial entre a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a aquisição de propriedades moleculares e funcionais de células-tronco (MANI et al. 2008; MOREL et al. 2008). Além do aumento do potencial de invasão e metástases, a indução da EMT em células epiteliais imortalizadas de tumores mamários humanos, elevou significativamente a sua capacidade de auto-renovação, e a expressão de marcadores associados as CTTs (MANI et al. 2008). Como a EMT pode ser esporadicamente desencadeada por estímulos extracelulares e por fatores do microambiente, estes achados fornecem uma possível explicação para a nova geração de CTTs provindas de células tumorais diferenciadas, e sugerem que a passagem pela EMT é relevante e/ou necessária para a tumorigênese (MAY et al. 2011).

Na tentativa de detectar as CTTs em tumores mamários de cadelas, realizamos ensaios imuno-histoquímicos em *Tissue MicroArrays* (TMA) de tecido parafinizado utilizando o anticorpo anti-CD44. Além deste, a marcação por anticorpos anti-citoqueratina e anti-vimentina foram analisadas para diferenciar o fenótipo epitelial do mesenquimal das células imunomarcadas pelos mesmos.

A técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *Tissue MicroArrays*, é uma técnica de conceito simples descrita por Kononen et al. (1998), que consiste em agrupar em um único bloco de parafina uma grande quantidade de amostras. Este método já vem sendo utilizado por pesquisadores da patologia investigativa da medicina humana pelas vantagens de menor tempo, custo e materiais utilizados nas pesquisas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*. Na medicina veterinária o método vem sendo difundido pelos patologistas, porém o custo das máquinas para a construção do TMA ainda é muito elevado. Por este motivo o presente estudo utilizou uma técnica de custo acessível utilizando o método descrito por Pires et al. (2006) modificada, para as análises dos tumores mamários de cadelas.

A utilização da técnica do cultivo celular *in vitro* também tem permitido estudos da biologia molecular tumoral de maneira mais controlada, pois

possibilita ter o controle preciso do ambiente físico-químico como a temperatura, umidade, pressão osmótica e tensão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (FRESHNEY, 2005).

Estudos vêm sendo realizados em células provenientes de tumores mamários *in vitro* para a compreensão de sua biologia molecular. Logo o estudo do comportamento, tanto de linhagens como de cultivos primários, se mostra valioso, pois novos achados podem auxiliar no aprimoramento das técnicas para diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes com câncer de mama. Para pesquisarmos a presença de CTTs *in vitro*, realizamos ensaios imuno-histoquímicos em cultivos primários de neoplasias mamárias de cadelas utilizando a técnica da citoinclusão. Além destes também foram feitas análise da expressão da telomerase por meio de qRT-PCR nas células cultivadas de neoplasias mamárias de cadelas e em amostras de tecido normal, a fim de estudar sua relação com a malignidade e com as CTTs.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS

A glândula mamária dos mamíferos é um órgão complexo, que sofre contínuas modificações durante a vida, particularmente devido ao crescimento corpóreo e a estimulação hormonal, existindo um amplo espectro de “normalidade” cito e histológica mamária (RUSSO et al. 1990). A cada prenhes ocorre proliferação do tecido glandular, diferenciação de ácinos que secretam leite e por fim involução dos componentes havendo preservação das estruturas (SORENMO et al. 2011). A mama consiste de dúctulos, ductos terminais intralobulares e ductos terminais extralobulares, que drenam para o ducto interlobular constituindo a chamada unidade ductal tubular terminal (TDLU) (RONNOV-JESSEN et al. 1996).

O epitélio glandular mamário é formado por células alveolares secretórias que variam de colunares a cuboides, e apresentam números variados de partículas de gordura intracitoplasmáticas (SORENMO et al. 2011). Os alvéolos drenam para ductos intralobulares secretores onde o epitélio ainda possui uma configuração mais colunar. Por sua vez esses ductos drenam para um ducto lobar revestido de epitélio cúbico não secretor que pode se expandir para armazenar o leite antes deste ser drenado para o seio lactífero onde o orifício interno é marcado pela transição para epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (BANKS, 1991). Há uma camada de células mioepiteliais de formato fusiforme a estrelado anteriormente a camada basal que circunda todos os alvéolos e ductos. Para oferecer o suporte necessário às células, o tecido mesenquimal se encontra entremeado aos alvéolos e ductos, e consiste de tecido fibroso, adipócitos, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Ocasionalmente podem ser observados histiócitos, mastócitos e células linfóides (SORENMO et al. 2011). A glândula apresenta tecido conjuntivo

frouxo bem vascularizado com feixes de fibras musculares lisas e fibras elásticas ao redor dos grandes ductos (BANKS, 1991).

## 2.2 NEOPLASIAS DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE CADELAS

As neoplasias mamárias na espécie canina têm sido utilizadas como modelo de estudo para as neoplasias mamárias na mulher, preterindo-se o processo em murinos, devido às várias características comuns, como a similaridade histológica e imuno-histoquímica, a elevada incidência, a natureza heterogênea das populações humana e canina, o grande número de recidivas e a ausência de envolvimento viral na etiologia do processo (MADEWELL & THEILEN, 1987; MOTTOLESE et al., 1994).

Os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento de tumores mamários nas cadelas são a idade avançada e a exposição hormonal (SORENMO et al. 2011). Outros fatores como a raça, a dieta e a obesidade também tem sido associados aos tumores mamários (BRONDEN et al. 2010; GOLDSCHMIDT et al. 2001; SCHNEIDER et al. 1970). A média de idade para o aparecimento de neoplasias mamárias depende da expectativa de vida de cada raça, porém estudos realizados com raças diversas reportam uma média entre 8 a 11 anos, demonstrando ser esta uma patologia de fêmeas de meia idade a idosos (BRODEY et al. 1983; HELLEMEN et al. 1993; KORSCHING et al. 2005; PRIESTER, MANTEL 1971; SCHNEIDER, 1970; SHOFER et al. 1989). Segundo Schneider et al. (1970), a exposição aos hormônios ovarianos endógenos é um importante fator de risco. Neste estudo foi observado que cadelas submetidas à ovariectomia (OSH) antes do primeiro estro apresentavam apenas 0,5% de chance de desenvolvimento de tumores, aquelas que realizaram a OSH entre o primeiro e o segundo estro apresentaram 8% de chance e, entre o segundo e o terceiro estro 26%. Já as

cadelas ovariectomizadas após o terceiro ciclo estral não apresentaram efeitos de prevenção significativos.

Estudos epidemiológicos demonstram que fêmeas caninas de raças pequenas têm maior incidência de tumores mamários, porém algumas raças de grande porte já foram relatadas apresentando elevado risco para estas neoplasias (BRODEY et al. 1983; BRONDEN et al. 2010; GOLDSCHMIDT et al. 2001; MOE, 2001). Estes resultados observados quanto as raças mais predispostas, apresentam variações dependendo da região onde o estudo foi realizado (SORENMO et al. 2011).

Nas cadelas, as neoplasias mamárias são relativamente fáceis de serem detectadas pelo proprietário ou por exame físico de rotina. Os achados clínicos podem variar de acordo com o comportamento biológico do tumor, e do estágio da doença no momento em que o animal é examinado (CASSALI et al. 2011; SORENMO et al. 2011). Em aproximadamente 70% dos casos o animal apresenta mais de um tumor na mesma mama ou são multicêntricos, envolvendo várias mamas, sendo as inguinais e abdominais caudais as mais comumente acometidas (GOLDSCHMIDT et al. 2001; MISDORP et al. 1999; SORENMO et al. 2011). A apresentação clínica é bem variada podendo haver tumores pequenos com menos de 1cm, até nódulos grandes com mais de 15cm de diâmetro, aderidos ou não à musculatura ou pele, ulcerados, macios ou firmes e por vezes acompanhados de reação inflamatória local (CASSALI et al. 2011; MISDORP et al. 1999; SORENMO et al. 2011). As neoplasias mamárias apresentam tipos histológicos diferentes e as suas classificações variam consideravelmente (CASSALI et al. 2011; GOLDSCHMIDT et al. 2011). A classificação histológica de neoplasias que acometem os animais domésticos, incluindo tumores e displasias da glândula mamária, publicada por Misdorp et al. (1999) é ainda o sistema de classificação mais adotado. Porém desde a sua publicação, subtipos histológicos novos já foram encontrados em cadelas, havendo discordâncias entre autores, tornando difícil a adoção de um único método de classificação histológica pelos patologistas (CASSALI et al. 2011; GOLDSCHMIDT et al. 2011; MEUTEN, 2002).

Os animais portadores de lesões na glândula mamária devem ser submetidos a exame físico completo, com palpação cuidadosa de toda a cadeia mamária e avaliação clínica geral para a obtenção de diagnóstico de qualidade (CASSALI et al. 2011; DALECK et al. 1998). Também se faz necessária anamnese completa com todo histórico clínico e informações sobre o ciclo reprodutivo (DALECK et al. 1998). A excisão cirúrgica dos tumores é o tratamento de eleição inicial, por meio de mastectomia, seguida de avaliação histopatológica das formações e de linfonodos quando removidos juntos com a cadeia mamária, pois somente a histopatologia oferece o diagnóstico morfológico definitivo (CASSALI et al. 2011; SORENMO et al. 2011).

O estadiamento clínico se faz necessário na tentativa de estabelecer tratamento e prognóstico do animal, e é comumente descrito de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo T a extensão do tumor primário, N a condição do linfonodo regional, e M a presença de metástases (OWEN, 1980). Este sistema foi uma proposta inicial para estudos relacionados aos prognósticos de tumores mamários em cães e gatos. Apesar de estudos feitos nessa área desde então, ainda não foi estabelecido uma conduta comum para análise prognóstica dessas neoplasias (MATOS et al. 2012).

## 2.3 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

As células-tronco podem ser encontradas no organismo adulto, em regiões como na medula óssea, no epitélio intestinal e outros tecidos altamente regenerativos. Estas células possuem um número definido nos tecidos diferenciados, sofrem mitoses e originam um número elevado de células filhas. Esta capacidade é que proporciona a perpetuação e a permanência deste tipo celular nos tecidos. A função das células filhas e das células diferenciadas depende da influência herdada das células mãe. As células-tronco podem estar

no tecido diferenciado assim como no tecido embrionário, residindo sua aplicação nas pesquisas desde a produção de clones até no reparo tecidual (TAI et al., 2005).

Uma característica importante das células-tronco é a capacidade de se diferenciar e de se auto-renovar. A divisão destas células pode ser simétrica, quando as duas células filhas retêm o mesmo fenótipo da célula mãe, ou assimétrica, quando cada filha apresenta componentes citoplasmáticos distintos com fatores de transcrição capazes de regular a expressão de genes de diferenciação celular (HILL, PERRIS, 2007). Estas últimas são chamadas células progenitoras, as quais perdem a capacidade de auto-renovação e são o vínculo entre as células tronco e as células maduras. Quando a diferenciação celular ocorre por completo há perda destas características imaturas das células, fase esta, em que a célula é conhecida como uma célula adulta especializada. O desenvolvimento das células tronco de diferentes órgãos pode apresentar variações, porém todas as células tronco do organismo necessitam de um balanço entre as características de auto-renovação e diferenciação celular (WU, 2007). Para que ocorram estes estímulos, as células tronco necessitam da ativação de genes que participam desses processos. Muitos destes genes se encontram em vias que são associadas também as neoplasias. As células-tronco e as neoplásicas possuem muitas similiaridades fenotípicas (REYA et al., 2001; PARDA et al. 2003; FEINBERG, 2005). Estas características contribuem para a renovação ou imortalidade, devido à alta capacidade proliferativa, promoção de metástases, e indução de neoplasias derivadas das células-tronco adultas (PARDA et al. 2003; TROSKO, 2003; TAI et al., 2005). A elevada proliferação celular como ocorre no trato gastrointestinal, fígado e também nas células-tronco, ou seja, células lábeis ou quiescentes que estão em constante renovação, permitem o acúmulo de mutações somáticas, alterações cromossômicas, ou mudanças epigenéticas que contribuem para a transformação neoplásica (REYA et al., 2001; PARDA et al. 2003).

As células tronco tumorais (CTTs) podem ser originadas por mutações em células tronco, células progenitoras e em células maduras (WU, 2007). O modelo das CTTs propõe que tumores, assim como tecidos normais, são organizados em uma hierarquia, onde apenas as CTTs têm potencial tumorigênico e proliferativo ilimitado (CLARKE et al. 2006). Considerando que a hipótese das CTTs não estipula uma célula de origem para cada neoplasia em particular, é razoável supor que os tumores podem se originar a partir da transformação de células-tronco do tecido normal, ou de células progenitoras diferenciadas (MAY, 2011), porém se a mutação pode ocorrer em células progenitoras e maduras, as células transformadas devem reaver o seu potencial de auto-renovação (MAY, 2011; WU, 2007). Existem duas hipóteses para esta transformação, que a célula pode “desdiferenciar” para uma célula tronco, ou que genes associados a auto-renovação sejam ativados (SELL, 1993; WU, 2007). As células tronco tumorais foram descritas como sendo um pequeno grupo de células neoplásicas de um tumor, que formam um reservatório de células de auto sustentação com a exclusiva habilidade de auto-renovação e criação de linhagens heterogêneas de células que compõem a neoplasia (CLARKE et al. 2006). Sendo assim, estas são capazes de levar ao crescimento tumoral, a progressão e a metástase, devido as suas características (RICARDO et al. 2011).

Modelos alternativos de desenvolvimento e manutenção tumoral existem, bem como a hipótese da evolução clonal, que propõe o surgimento contínuo de subpopulações tumorigênicas pelas constantes mutações e clonagens destas células (NOWELL, 1976; BLACKING et al. 2011). É possível que em certos tumores, a combinação destes processos seja mais condizente com o comportamento tumoral (SHIPITSIN, POLYAK, 2008; SHACKLETON et al. 2009).

Em camundongos imunocomprometidos, foram implantadas células de carcinomas mamários humanos que expressavam proteínas de membrana putativas de células tronco identificadas e isoladas por citometria de fluxo como linhagens CD44 positivas e CD24 negativas. Foi observado que em média 100

destas células tinham a capacidade de formar novos tumores, em contrapartida a implantação de mais de 10000 células tumorais que não expressavam as proteínas não foi capaz de formar novas neoplasias nos animais (AL-HAJJ, CLARKE, 2004). Estas células mostraram-se indutoras da transformação neoplásica e de grande habilidade na preservação deste tipo celular na implantação de novos tumores. As características fenotípicas destas células incluem a habilidade de reprogramar o tumor quando implantado nas cobaias, portanto, estudos sugerem que estas populações distintas de células são semelhantes às células-tronco e responsáveis pela manutenção do respectivo tumor (AL-HAJJ, CLARKE, 2004; WEBSTER et al., 2007).

Em células tronco embrionárias já foi observada expressão de uma enzima que evita o encurtamento dos telômeros, a telomerase, que só se mantém, porém diminuída, em células tronco adultas, linfócitos ativos e queratinócitos (WRIGHT, et al. 1996). Apesar dessa diminuição da sua expressão a sua presença nestas células adultas sugere que a telomerase tem um importante papel na biologia das células tronco (PANG, ARGYLE, 2009). Em humanos, mutações no gene que codifica a telomerase foram relacionadas a patologias caracterizadas por perda prematura da regeneração tecidual devido a perda da atividade da telomerase, exaustão das células tronco, insuficiência de medula óssea e morte prematura (VULLIAMY et al. 2001; VULLIAMY et al. 2002). Estudos em camundongos demonstraram que o encurtamento dos telômeros reduz as funções das células tronco, e está relacionada a um comprometimento da homeostase e redução da expectativa de vida (LEE et al. 1998), porém a super expressão da telomerase resulta num aumento da tumorigênese (ARTANDI et al. 2002).

## 2.4 PROTEÍNA DE CÉLULAS TRONCO

O CD44 é uma glicoproteína de membrana tipo I que apresenta um pequeno domínio citoplasmático, um domínio transmembrânico, uma região em membrana proximal altamente glicosilada e um domínio de ligação hialurônico N-terminal (WOLNY et al. 2010). O CD44 é um receptor de membrana celular para o ácido hialurônico, que consiste no glicosaminoglicano mais abundante da matriz extracelular da maioria dos tecidos dos mamíferos (LAURENT et al. 1992; BORLAND et al. 1998). O gene CD44 está localizado no cromossomo 11p13 e consiste de 19 exons codificados, dos quais 9, residem entre os exons constitutivos 5 e 6, que podem se ligar de maneiras diferentes, formando diferentes isoformas dependendo do tecido e da expressão de diferenciação específica. O epítipo reconhecido pelos anticorpos anti-CD44 (clones 156-3C11 e G44-26) mais utilizados para o isolamento das CTTs está situado na região amino-terminal do CD44, onde estão localizados os exons não variáveis 1 a 5, indicando que todas as isoformas do CD44 devem ser detectadas por estes anticorpos (ORIAN-ROUSSEAU, 2010). O CD44 é encontrado em vários tipos celulares, incluindo leucócitos, condrócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais e vem sendo implicado a vários processos como recrutamento de linfócitos, sinalização de células T, adesão de matriz celular, apoptose, angiogênese e metástases. O papel da sua ligação ao ácido hialurônico nestes processos tem sido motivo de estudos, já que a sua propensão a esta ligação varia muito entre tipos celulares e seu estado de maturação (DAY, DE LA MOTTE, 2005; PURÉ, CUFF, 2001; WOLNY et al. 2010). O CD44 também fornece uma ligação entre a membrana plasmática e a actina do citoesqueleto, que modula o formato da célula e sua motilidade (PONTA et al. 2003; ORIAN-ROUSSEAU, 2010). O primeiro experimento utilizando linhagens de células provenientes de tumores mamários humanos, foi publicado por Al-Hajj et al. (2003), a fim de analisar a expressão de CD44 e CD24 como marcadores putativos das CTTs, utilizando citometria de fluxo. Foi observado que a tumorigenicidade estava em células que expressavam CD44 positivo e CD24 negativo. Desde então a expressão do CD44 sozinho ou em

conjunto com outros marcadores como CD24, CD133 e o ALDH, vem sendo relatado como identificador das CTTs em tumores primários e linhagens celulares de diversas origens (COLLINS et al. 2005; DALERBA et al. 2007; PRINCE et al. 2007; FILLMORE, KUPERWASSER, 2008; TAKAISHI et al. 2009). O CD44 já foi associado ao aumento das propriedades invasivas (GINESTIER et al. 2007; LIU et al. 2007), a resistência a radio e quimioterapia (PHILLIPS et al. 2006; LI et al. 2008) e consequentemente pior prognóstico (GINESTIER et al. 2007; LIU et al. 2007). Em tumores mamários caninos poucos estudos foram feitos para analisar a expressão do CD44 como marcador de CTTs (BLACKING et al. 2011; PALTIAN et al. 2009).

## 2.5 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

A EMT é um processo essencial no desenvolvimento animal, que possibilita a reprogramação de células epiteliais polarizadas para um fenótipo mesenquimal de maior motilidade. Durante o desenvolvimento embrionário, a EMT possibilita a diminuição do contato célula-célula, melhorando assim a motilidade celular e abrindo caminho para as inúmeras movimentações necessárias na gastrulação e organogênese (MAY et al. 2011; THIERY et al. 2009; POLYAK, WEINBERG, 2009). Essa mudança fenotípica do epitélio para uma morfologia fusiforme é dada por vias integradas de sinais de transdução e por fatores de transcrição, relacionados a expressão alterada de genes responsáveis pela adesão celular, diferenciação e motilidade (MAY et al. 2011). Nos primeiros estágios da EMT ocorre a degradação da E-caderina, um importante componente da adesão célula-célula (JANDA et al. 2006). As células não só perdem características epiteliais, como também voltam a expressar genes associados a células mesenquimais como a fibronectina e a vimentina (MAY et al. 2011). Estas mudanças permitem que a célula migre independentemente e invada o estroma atravessando a membrana basal (MAY

et al. 2011). Em tecidos neoplásicos, a EMT pode ser estimulada para que seja aumentado o seu potencial de migração e invasão, necessário para a progressão e metástase tumoral (THIERY et al. 2009; POLYAK, WEINBERG, 2009). Em neoplasias mamárias foi associada a indução de EMT à marcação positiva de CD44 e outras características de células tronco, sugerindo um fenótipo antigênico que poderia detectar CTTs associadas a EMT com elevada capacidade tumorigênica (MANI et al. 2008; PANG et al. 2011).

## 2.6 CULTIVO CELULAR

As linhagens celulares constituem modelos experimentais adequados para a investigação da tumorigênese, diferenciação, resposta a tratamentos, regulação genética e da caracterização do crescimento das células em cultura, constituindo um importante meio de análises de fenômenos neoplásicos e da biologia tumoral (VILELA et al. 1998; VARGO-GOGOLA, ROSEN, 2007). As culturas obtidas a partir de fragmentos de órgãos ou tecidos tumorais são ditas primárias. A partir destes cultivos podem ser obtidas as linhagens celulares, que por meio de alterações genéticas, conferem as células um crescimento rápido e contínuo, se tornando imortalizadas (LEWIN, 1996). As culturas primárias podem ser adquiridas tanto de fragmentos do tecidos aderidos a um substrato, permitindo assim que as células migrem, ou desagregando o tecido mecanicamente e enzimaticamente para produzir uma suspensão de células que podem se aderir ao substrato (FRESHNEY, 2005). Em cultivo de tumores mamários de camundongos o melhor método testado foi o cultivo a partir de explantes, podendo ser mantido por mais de três meses gerando subcultivos e linhagens imortalizadas (PEI et al. 2004).

Segundo Mcdonald (1996) os cultivos celulares comumente exibem certas propriedades como: dependência de ancoragem, quando as células necessitam se ligar a uma superfície sólida para sobreviverem e proliferarem;

monocamada, quando a distribuição das células é observada em uma única camada sobre o substrato; a dependência de soro fetal, que fornece substâncias essenciais para as células; e inibição densidade-dependente, isto é, quando há o estabelecimento da confluência (ocupação de todo o substrato disponível na garrafa), a atividade proliferativa diminui notavelmente.

As células em cultivo normalmente apresentam um modelo de curva de crescimento sigmóide, o que reflete a adaptação à cultura, o suprimento nutricional necessário para sustentar a proliferação celular, as condições ambientais e do substrato. Após a introdução das células em cultivo, elas passam por uma fase onde não se dividem (fase lag), seguidas de um período de atividade proliferativa, com aumento exponencial do número de células (fase log), para só então atingirem a fase do platô, onde a proliferação diminui e a população chega à confluência. Finalmente, ocorre um período de declínio no número de células como consequência da senescência e morte celular (MCATEER, DAVIS, 1996; VILELA et al. 2007).

Para que as células se tornem imortalizadas, se faz necessária uma transformação, que tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por derivados do meio ambiente ou por transformações genéticas (MCDONALD, 1996; LEWIN, 1996). Exposições a certos produtos químicos carcinógenos, radiações, transfecção por retrovírus ou DNA de vírus tumorigênicos de oncogenes e genes supressores de tumor podem levar as células a se tornarem linhagens estáveis (LEWIN, 1996; LOPES et al. 2005).

## 2.7 TELOMERASE

Células normais têm um período de vida preciso e se multiplicam até um ponto crítico, entrando em senescência e consequente morte celular (ZAVLARIS et al. 2009). Este envelhecimento é controlado pelos telômeros, que são estruturas especializadas, formadas de nucleoproteínas e que se

encontram nas extremidades finais dos cromossomos (YAZAWA et al. 1999; ZAVLARIS et al. 2009) Nos mamíferos, os telômeros são repetidas sequências ricas em guanina (TTAGGG) orientadas de 5' a 3', e que estão relacionadas a diversas funções (PANARESE et al. 2006; PANG, ARGYLE, 2010). Elas mantêm a integridade do cromossomo, influenciam a transcrição de genes localizados perto das extremidades, permite que a dupla hélice de DNA seja completamente replicada e participa da segregação meiótica do cromossomo e da organização do núcleo (PANARESE et al. 2006).

Os telômeros encurtam a cada replicação de DNA devido a incapacidade da DNA polimerase de replicar a extremidade final dos cromossomos lineares, perdendo aproximadamente de 50 a 200pb do genoma telomérico (YAZAWA et al. 1999; ZAVLARIS et al. 2009). Este encurtamento progressivo representa um mecanismo supressor de tumor, pois quando alcança um comprimento crítico, a célula entra em senescência e não passa da fase G<sub>1</sub> do ciclo celular perdendo sua viabilidade (PANARESE et al. 2006; PANG, ARGYLE, 2009). Células neoplásicas possuem mecanismos que contornam o encurtamento dos telômeros, evitando a senescência, permitindo assim uma proliferação contínua (ZAVLARIS et al. 2009). É conhecido que a enzima telomerase mantém os telômeros sintetizando DNA telomérico (PANG, ARGYLE, 2009).

A telomerase é uma ribonucleoproteína complexa, formada por um RNA modelo (TERC), que contém uma região complementar a sequência TTAGGG, e uma subunidade de transcriptase reversa catalítica (TERT). A holoenzima telomerase se liga ao telômero pelo alinhamento do RNA modelo a sua sequência repetitiva, catalizando a adição de novas sequências teloméricas na extremidade do cromossomo (NAKAMURA et al. 1997; PANG, ARGYLE, 2009). Apesar do RNA modelo e da subunidade catalítica serem importantes, o componente TERT é o principal determinante para a atividade da enzima, visto que a sua expressão é limitada apenas em células com a telomerase ativa (DUCREST et al. 2001; NASIR et al. 2004). Já a subunidade TR é expressa em

todos os tecidos, independente da atividade da telomerase (AVILION et al. 1996).

Estudos na oncologia comparada vêm se mostrando importantes na obtenção de melhores tratamentos, prognósticos e modelos experimentais (ARGYLE, NASIR, 2003). O gene que codifica TERT já foi caracterizado em várias células eucarióticas, incluindo ratos e humanos (NAKAMURA et al. 1997). Em cães Nasir et al. (2004) isolaram e caracterizaram a subunidade catalítica da telomerase (dogTERT), que consiste de 1123 aminoácidos com as principais características da família TERT. Demonstraram ainda que a proteína dogTERT tem a maior similaridade de sequências comparando-se a proteína TERT humana entre todas as outras já isoladas de outros mamíferos.

Em tumores da glândula mamária de cadelas, alguns autores obtiveram achados discrepantes quanto a atividade da telomerase, tanto em tecido mamário livre de neoplasias, como em tumores benignos e malignos (FUNAKOSHI et al. 2000; NOWAK et al. 2008; PANARESE et al. 2006; ZAVLARIS et al. 2009), tornando necessários novos estudos para a confirmação de seu papel como marcador tumoral.

A telomerase também é expressa em células tronco normais, porém em baixa quantidade, e tem sido sugerido que esta seria uma característica também das CTTs. Esta suposição se torna difícil de validar pela inabilidade de isolamento de uma população exclusivamente formada por estas células (PANG, ARGYLE, 2010).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as expressões de CD44, citoqueratina e vimentina em glândulas mamárias e cadelas *in vivo* e *in vitro* por meio da imuno-histoquímica e/ou de PCR em tempo real.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a distribuição da imunomarcacão do CD44, da citoqueratina e da vimentina em tumores benignos e malignos da glândula mamária, e avaliar a relação entre os mesmos e a transição epitelial-mesenquimal nestas neoplasias.
- Analisar quantitativamente a expressão da telomerase nas células neoplásicas cultivadas e em tecido mamário normal por meio de PCR em tempo real.
- Elaborar protocolos de cultivo primário de células tumorais mamárias, determinando a eficiência dos meios e a habilidade dos cultivos de se expandirem *in vitro*.
- Analisar a expressão dos achados imuno-histoquímicos em TMAs dos tecidos emblocados em parafina, de citoinclusões obtidas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), e das células provenientes dos cultivos.

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS

As amostras estudadas foram obtidas junto ao Serviço de Patologia Veterinária de onde foram selecionados 49 casos de tumores mamários em cadelas entre os períodos de 1995 a 2010. Os casos tiveram reavaliação anatomopatológica e classificados de acordo com Cassali et al. (2011). Destes casos foram preparadas lâminas histológicas de TMAs utilizando o método descrito por Pires et al. (2006) modificado. Para a realização dos cultivos celulares foram coletadas amostras de tumores mamários de cinco cadelas durante o procedimento cirúrgico. Para tal, após a excisão cirúrgica do tumor, foram coletados fragmentos representativos do mesmo, de aproximadamente 0,5cm de diâmetro, dos quais, partes foram colocados em tubos estéreis contendo 1ml de meio de cultura RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino em temperatura ambiente, e parte fixados em frascos contendo formaldeído 10%. Ainda no momento da coleta, foi feita uma punção aspirativa por agulha fina das neoplasias, que era colocada em tubos estéreis contendo álcool 95% e centrifugada imediatamente a 1800 rpm por 5 minutos, para a realização de citoinclusão. Para a obtenção do grupo controle da PCR para a análise da telomerase, foram coletadas também 6 amostras de tecido mamário de cadelas livres de neoplasias, encaminhadas ao Serviço de Patologia Veterinária para exame necroscópico, e armazenadas em tubos estéreis contendo uma solução crioprotetora de RNA (RNA holder, BioAgency, Brasil) em freezer – 20°C.

### 4.2 PREPARO DAS LÂMINAS DE *TISSUE MICROARRAYS*

Para a construção das lâminas de TMA, foram utilizadas agulhas hipodérmicas 40x16 que tiveram as suas pontas cortadas e feita uma pequena abertura lateral de aproximadamente 2mm imediatamente abaixo do canhão. A agulha modificada foi então acoplada a uma máquina de ilhós manual, onde foram retirados cilindros dos blocos de parafina dos casos selecionados, previamente marcados em áreas que continham amostra de tecido neoplásico. Para retirar os cilindros de dentro da agulha foi utilizada uma pequena haste de metal colocada pela abertura lateral, podendo assim empurrar a amostra de tecido. Uma fita adesiva dupla face foi colocada no fundo de uma forma de metal para inclusão de blocos em parafina, onde foram marcados com caneta permanente pontos separados a cada 2mm de distância, locais onde os cilindros foram colados na vertical. Após todas as amostras serem coladas na forma, foi adicionada parafina na temperatura de 56 – 58° C (Figura 1). Destes blocos foram feitos cortes histológicos de 3µm e depositados em lâminas que foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina, em seguida montadas e analisadas à microscopia óptica (Olympus CX41).

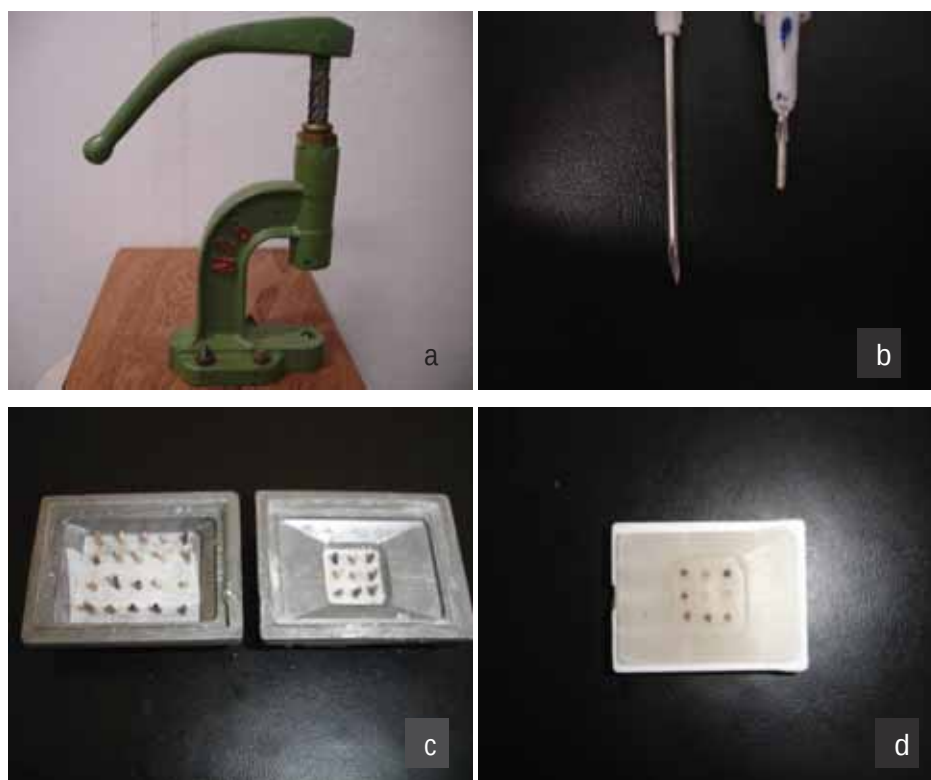


Figura 1 – Preparo dos blocos de TMA; a) Máquina manual para aplicação de ilhós utilizada para a obtenção dos cilindros com as amostragens do TMA; b) À esquerda, agulha hipodérmica 40x16normal; À direita agulha com a ponta cortada e com a janela lateral, que foi acoplada à maquina de ilhós; c) Formas de metal para inclusão de blocos em parafina com os cilindros já colados em dois tamanhos diferentes, com 20 e 9 cilindros; d) Bloco de parafina do TMA de tamanho pequeno com 9 cilindros de amostras diferentes.

### 4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS TMAS

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados utilizando-se protocolo pré-estabelecido. Foram retirados cortes de 3 $\mu$ m dos blocos de TMAs, que foram depositados em lâminas contendo Poly-L-Lisina. Foram utilizados os anticorpos Anti-Citoqueratina (Clone AE1/AE3, Monoclonal Mouse Anti Human, Dako, USA), na diluição 1:300; Anti-Vimentina (Clone V9, Monoclonal Mouse Anti Swine, Dako, USA) na diluição 1:400 e CD44 (Clone YKIX337.8.7, Monoclonal Rat Anti Dog, Serotec) na diluição 1:100. Após a desparafinização em estufa a 60°C, foram feitas passagens em três baterias de Xilol por 10

minutos cada. Em seguida foi feita a re-hidratação em alcoóis regressivos de vão de 100% a 50%, seguidos de água corrente por aproximadamente 5 minutos cada banho. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 em microondas com três banhos de um minuto, e as lâminas deixadas para resfriar em água destilada por 15 minutos. Após resfriadas, foi feito banho de peróxido de hidrogênio 10 V, seguido de banho de metanol com peróxido de hidrogênio na proporção 1/10, para a inibição da peroxidase endógena, por 15 minutos cada banho em câmara escura. Para inibir as ligações inespecíficas foi utilizado 6 gramas de leite em pó desnatado Molico®, diluído em 100ml de água destilada por cerca de 30 minutos. As lâminas foram então colocadas em câmara úmida, onde receberam os anticorpos primários na diluição ótima, e então foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Sempre em cada uma das lâminas e nas duplicatas, um corte recebeu PBS ao invés do anticorpo primário, para servir de controle negativo da reação. A câmara foi então colocada sob refrigeração “overnight” (12h a 16h). Foi utilizado o método LSAB para detecção da reação antígeno-anticorpo de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas passaram por três banhos de 10 minutos em PBS, para depois receber a solução *Biotinylated Link Universal* (DAKO®) por 30 minutos em câmara úmida. Logo após, as lâminas receberam novos banhos de PBS e feita a incubação com a solução *Streptavidin Alkaline Phosphatase* (DAKO®) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida passaram por mais três banhos de PBS, para então iniciar a revelação do substrato cromógeno feito com Diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 5 minutos. A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris seguida de desidratação em baterias de alcoóis de concentrações crescentes (50% a 100%), três banhos em Xilol, para por fim, realizar a montagem e análise em microscópio óptico.

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO

A expressão da citoqueratina e da vimentina nos tecidos mamários foi quantificada baseada na imunoreatividade vista no citoplasma das células, e a expressão do CD44 baseada na imunoreatividade identificada na membrana citoplasmática. A análise foi feita utilizando-se o seguinte sistema de score: 0, sem marcação; 1, marcação em 1% a 25% das células; 2, marcação em 26% a 50% das células; 3, marcação em 51% a 75% das células; e 4 quando marcadas mais de 76% das células, visto em quatro campos na objetiva de 40x. (PALTIAN et al. 2009).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TMAS

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar a expressão de cada anticorpo entre os tipos de tumor nas amostras submetidas ao TMA. As estatísticas foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . As análises foram efetuadas empregando-se o programa SAS<sup>®</sup> (*Statistical Analysis System*), versão 9.2 (SAS, 2008).

#### 4.6 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

##### 4.6.1 RPMI Suplementado

Foi misturado um frasco (10,4g) de Meio de cultura RPMI 1640 (HIMEDIA<sup>®</sup>) em 900ml de água Milli-Q, depois adicionado 3,7g de bicarbonato de sódio e colocado no agitador. O pH foi ajustado para 6,9, pois depois o soro tende a aumentar o pH para 7,2 - 7,4. Em capela de fluxo laminar foi então adicionado 20ml de solução de Penicilina e Estreptomicina (5000UI/ml, Invitrogen<sup>®</sup>), 1ml de Fungizone<sup>®</sup> (2,5µg/ml, Gibco<sup>®</sup>), 5ml de MEGS<sup>®</sup> (Mammary Epithelial Growth Supplement, Invitrogen<sup>®</sup>) e 100ml de Soro Fetal Bovino. A esterilização foi feita por filtração com filtros de membrana de 0,22µm e então o meio suplementado foi aliquotado em garrafas estéreis e estocado a 4° C.

#### 4.6.2 Meio de Congelamento

Para que as células fossem congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido, foi preparado um meio específico para diminuir a perda de células. Este meio consiste de 1,4ml de DMSO<sup>®</sup> e 8,6ml de Soro Fetal Bovino, preparado em capela de fluxo laminar, aliquotado em tubos estéreis e armazenados a 4° C.

#### 4.7 CULTURA PRIMÁRIA

Utilizando a capela de fluxo laminar, foi colocado dentro de placas de plástico estéreis 1mL de RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino, 1mL de Fungizone<sup>®</sup> (2,5µg/ml), 1mL da solução de penicilina e estreptomicina (5000UI/ml, Invitrogen<sup>®</sup>), e os fragmentos tumorais coletados. Utilizando-se lâminas de bisturi, as amostras tumorais foram dissociadas mecanicamente até a obtenção dos explantes (fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>2</sup>), sendo desprezadas áreas de necrose, hemorragia e tecido adiposo. Com a ajuda de uma pipeta, o conteúdo da placa junto com os explantes foi passado para um tubo Falcon e centrifugado por 5minutos a 1800 RPM. O sobrenadante foi

então desprezado e os explantes acondicionados em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> própria para cultivo celular e adicionado 2,5mL de RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino, quantidade esta própria para que os explantes não fiquem flutuando no meio e possam aderir ao fundo da garrafa. As garrafas foram então acondicionadas em estufa a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade por 5 a 7 dias, sendo observadas rotineiramente em microscópio invertido, até haverem explantes aderidos. Quando aderidos, o meio das garrafas era então retirado com cuidado e adicionado 5mL de meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino.

O meio foi trocado a cada dois dias até que as células estivessem se soltando dos explantes e aderindo ao fundo da garrafa (Figura 2). Quando aglomerados celulares estavam formados, era feita uma tripsinização branda visando separar as células fibroblastóides das epitelíóides (BOTELHO, 2009). Para isso foi colocado 1mL de tripsina e 1mL de soro fisiológico estéril (tripsina 0,125%) por 2 a 3 minutos, para que apenas as células fibroblastóides fossem retiradas. Estas células foram passadas para outra garrafa pequena e a inativação da ação da tripsina foi realizada colocando-se 5mL de meio suplementado em cada garrafa.

Os fibroblastos liberam substâncias como, por exemplo, fatores de crescimento que estimulam a proliferação das células epiteliais (FRESHNEY 2005). Por este motivo foi trocado o meio da primeira garrafa a cada dois dias colocando-se 4 mL de meio com 10% de Soro Fetal Bovino e 1ml do meio de cultura condicionado pelas células fibroblastóides.

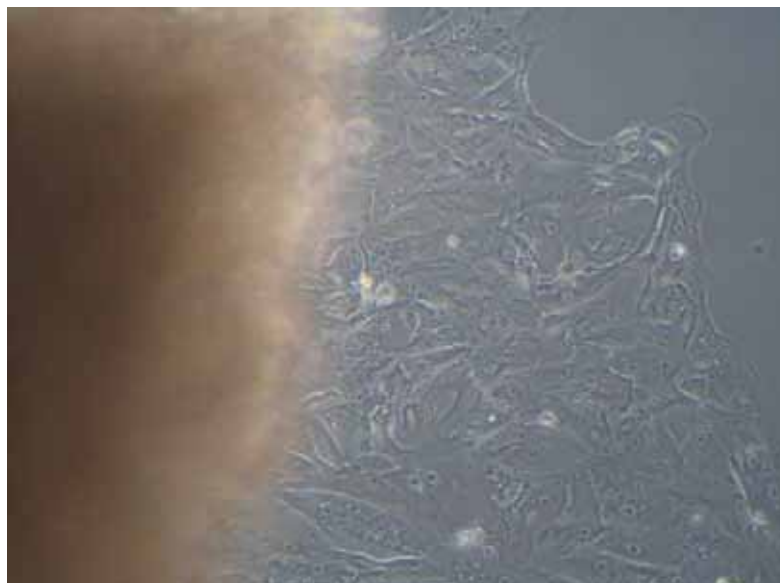


Figura 2 – Imagem de microscopia de luz invertida mostrando explante de tumor mamário de cadela, aderido ao fundo da garrafa, liberando células que também se aderem ao fundo para continuar a proliferação. Objetiva 10x.

#### 4.8 REPIQUE DAS CÉLULAS

Assim que as células atingiram confluência, foram repicadas a fim de se obter um aumento no número das mesmas. No seguinte estudo foram feitos de dois a três repiques para que as células atingissem a confluência em uma garrafa de cultivo celular grande, e depois fossem armazenadas por congelamento em nitrogênio líquido em tubos estéreis contendo 1mL de meio de congelamento e 1mL de meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino.

Para fazer a passagem das células, o meio da garrafa pequena foi desprezado, em seguida foi adicionado 2mL de tripsina a 37°C por 5min. A garrafa era então observada no microscópio invertido para verificar se todas as células haviam se soltado do fundo; se houvessem células ainda aderidas, batidas leves eram dadas na garrafa até que todas as células estivessem soltas. O conteúdo foi então passado para um tubo falcon e centrifugado a 1800 rpm por 5min. Depois de descartado o sobrenadante, 10ml de meio de cultura suplementado era colocado e passado para uma garrafa média.

No momento do terceiro repique, para que fossem melhor identificados os tipos celulares do cultivo, foram coletadas amostras para a realização de citoinclusão em parafina. Após a centrifugação, uma amostra do pellet de células formado, foi coletada com a ajuda de uma pipeta estéril, e colocada em álcool 95%.

#### 4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS CULTIVOS CELULARES

Parte das amostras coletadas foram fixadas em formaldeído 10% por 24 horas, assim como amostra retirada dos cultivos após dois a três repiques, que foram fixadas em álcool 95% por 24 horas. Tais amostras foram então desidratadas em baterias de alcoóis de concentração crescente de 70% a 100%, para então serem diafanizadas em Xilol. Só então foram incluídas em parafina.

Após a inclusão foram feitos cortes de 3  $\mu$ m de espessura que foram depositados em lâminas e desparafinados em estufa a 60°C. Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados utilizando-se o mesmo protocolo descrito anteriormente.

#### 4.10 EXTRAÇÃO DE RNA

Foi realizada extração de RNA das amostras de células cultivadas e dos tecidos mamários normais. Para tal, as amostras foram colocadas em cadinhos esterilizados, submersas em nitrogênio líquido, e então maceradas até a sua desintegração total. Para a lise celular foi utilizado *Qiazol Lysis Reagent* de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen<sup>®</sup>, Turnberry Lane, CA, USA). Em seguida a amostra foi transferida para um microtubo, então adicionado

250µl de clorofórmio seguido de agitação em vortéx e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 9000 rpm por 15min a 4°C para que ocorresse a separação em três fases, RNA, DNA e proteínas, respectivamente (Figura 3).

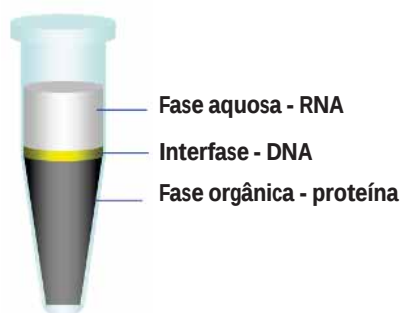


Figura 3 - Figura esquemática das três fases, respectivamente, RNA, DNA e proteínas após centrifugação no processo de extração de RNA.

A fase aquosa contendo RNA foi retirada cuidadosamente e transferida para um novo microtubo, onde foi adicionado 600µl de isopropanol. A amostra permaneceu em temperatura ambiente por 10min e então centrifugada á 9000 rpm/15min/4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 1,3ml de etanol 75% seguido de nova centrifugação á 9000 rpm/15min/4°C. O sobrenadante foi novamente retirado cuidadosamente e o microtubo com o pellet formado foi levado a estufa 37°C para a secagem total.

Após esse processo, o pellet foi resuspendido em 15µl de água livre de RNase (ultra pura) e incubado por 10 minutos à 55°C. O RNA extraído foi armazenado à -80°C.

#### 4.11 DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a mensuração da quantidade e pureza do RNA extraído foi utilizado espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, CA/EUA) que quantifica ácidos nucleicos. O espectro é visualizado em computador, onde o aparelho

salva os dados em planilhas compatíveis com o Microsoft Excel. A pureza do material é verificada através da relação 230/260 e 260/280, onde no comprimento de onda 260 é lido o ácido nucleico e no 280 a proteína, e a relação ideal desejada deve estar entre 1,6 e 2. Esta relação detecta se a amostra está contaminada com DNA (comprimento de onda 260), proteínas (comprimento 280) ou reagentes utilizados na extração (comprimento 230).

A quantidade de RNA obtida é dada em ng/μl, e para obtermos uma padronização, todas as amostras foram diluídas para 100 ng/μl.

#### 4.12 SÍNTESE DE cDNA

Para a realização da síntese de cDNA foi utilizado o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, California, United States). Para a eliminação do DNA genômico foram misturados 2μl de gDNA Wipeout Buffer, 2μl da amostra de RNA já diluída (100 ng/μl) e 10μl de água livre de RNAses, e colocado em termociclador por 2min á 42°C. Foi então adicionado 1μl de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4μl de Quantiscript RT Buffer (5x) e 1μl de RT Primer Mix (oligo-dT e random primers). As amostras foram colocadas novamente em termociclador por 15min á 42°C seguido de um ciclo de 3min á 95°C para a inativação da transcriptase reversa. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C.

#### 4.13 PCR EM TEMPO REAL

Foi realizada a quantificação da expressão dos genes  $\beta$ -actina e dTERT por qRT-PCR. Foi utilizado o equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystem) baseado na metodologia *TaqMan*. Foram então

misturados 12,5µl de 2x *TaqMan* Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), 1,25µl do ensaio *TaqMan*, sendo utilizado dois primers, ambos para tecido de cão,  $\beta$ -actina (cf 03023880\_g1) sequência CGTCTTCCCCTCCATCG e telomerase (cf 02671897\_m1) sequência TTAGGGTTAGGG, 1µl da amostra de cDNA, e 10,25µl de água livre de RNase. As condições da PCR foram indicadas pelo fabricante sendo 40 ciclos de 21 segundos á 95°C e 20 segundos á 60°C. A quantidade de cDNA *dTERT* do grupo controle foi comparada às respectivas quantidades observadas nas células tumorais cultivadas. O gene  $\beta$ -Actina foi utilizado como normalizador das reações. Os resultados foram analisados pelo método  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK et al, 2001), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de produto} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \{[Ct(hTERT_{amostra}) - Ct(\beta\text{-Actin}_{amostra})] - [Ct(hTERT_{calibrador}) - Ct(\beta\text{-Actin}_{calibrador})]\}$$

#### 4.13.1 Análise estatística da PCR

Foi utilizado o teste t de *Student* na comparação entre os valores de mRNA *dTERT* encontrados no grupo controle e nas amostras de células tumorais cultivadas, sendo considerado significante valores menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE ANATOMOPATOLÓGICA

Foram analisados 49 casos de tumores mamários em cadelas, dos quais 21/49 (42,8%) foram classificados como neoplasias benignas, e 28/49 (57,1%) como formações malignas. A idade do animal é um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento dos tumores mamários de cadelas (SORENMO et al. 2011). O estudo analisando tumores mamários espontâneos em beagles, observou que a incidência começava a ser significativa por volta dos 8 anos de idade, e aumentava nas idades avançadas (TAYLOR et al. 1976). No presente estudo a idade dos animais acometidos variou de 3 a 15 anos, apresentando uma média de 9,3 anos (Figura 4). Este resultado concorda com Dorn et al. (1968), que documentaram maior incidência em animais de 9 a 11 anos, analisando cadelas de várias raças distintas. Apesar de autores concordarem com a maior incidência na faixa etária entre 8 a 11 anos (BRODEY et al. 1983; HELLEMEN et al. 1993; KORSCHING et al. 2005; PRIESTER, MANTEL 1971; SCHNEIDER, 1970; SHOFRER et al. 1989), a expectativa de vida de cada raça, também é um fator importante.

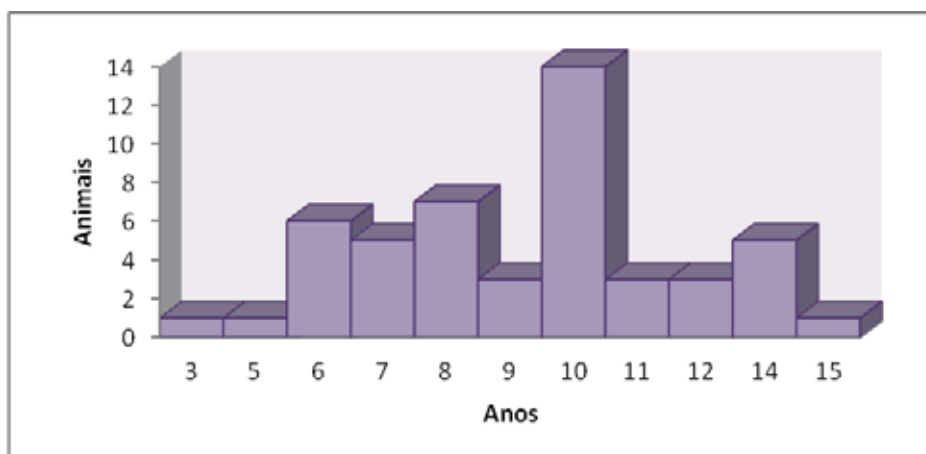


Figura 4 – Distribuição da idade dos animais (n=49), quando da excisão cirúrgica da neoplasia mamária.

Os estudos em relação às raças acometidas são controversos, pois variam muito dependendo do país, cidade ou até da região onde foi conduzido o estudo. Neste sentido, estudos europeus apontam os animais da raça boxer como os de maior incidência (BRONDEN et al. 2010; MOE, 2001), enquanto estudos norte americanos mostram a raça sub representada (BRODEY et al. 1983; GOLDSCHMIDT et al. 2001). A raça de maior incidência em nossa região foi a SRD (sem raça definida), ocorrendo em 40,8% (20/49) dos casos, seguida das raças Pastor Alemão e Pinscher, ambos aparecendo em 12,2% (6/49) dos casos (Figura 5).

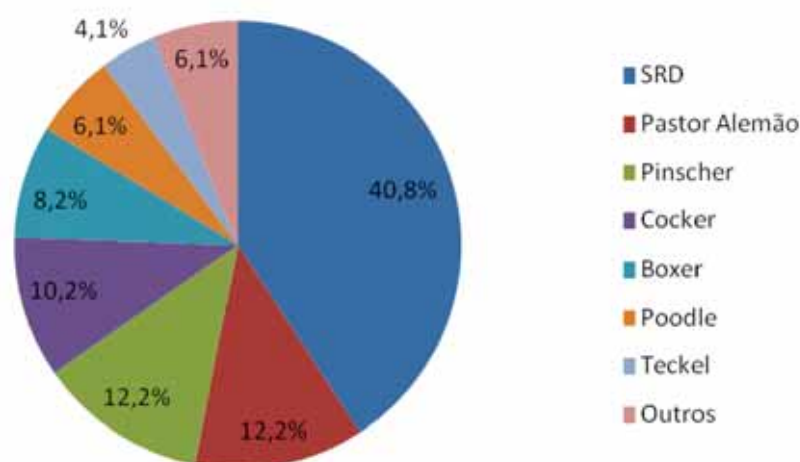


Figura 5 –Distribuição dos animais portadores de tumores mamários incluídas no estudo, segundo o padrão racial.

A classificação dos tipos histopatológicos dos tumores mamários de cadelas ainda constitui motivo de estudo e de grande impacto na Medicina Veterinária. Por este motivo foram adotados os critérios propostos por Cassali et al. (2011) a fim de se obter uma padronização nos diagnósticos elaborados. Das neoplasias benignas, o papiloma ductal (n=2) foi caracterizado pela proliferação ordenada de epitélio ductal, formando apenas uma camada de células, sobre eixos fibro-vasculares no interior de ductos distendidos, sem apresentar pleomorfismo e observadas raras figuras mitóticas; o adenoma complexo (n=6) mostrou proliferação tanto de células epiteliais luminais quanto mioepiteliais, em focos de arranjo sólido com células epiteliais bem diferenciadas, entremeadas por células alongadas, porém sem a presença de matriz mixóide, apresentando atividade mitótica e pleomorfismo reduzidos; Os tumores mistos benignos diagnosticados (n=13) apresentavam proliferação benigna de células epiteliais e mioepiteliais, com arranjo semelhante ao dos adenomas complexos, acompanhado de metaplasia cartilaginosa e/ou óssea. Os tumores malignos foram classificados como: carcinoma tubular (n=1) havendo proliferação epitelial maligna, de pleomorfismo moderado a elevado, índice mitótico alto e de arranjo predominantemente tubular; carcinoma em tumor misto (n=5), quando observados focos de proliferação carcinomatosa,

caracterizados por acentuada atipia em tumores mistos benignos; carcinoma papilar (n=10) que se caracterizaram por crescimento em padrão arborescente papilar do epitélio mamário em ductos dilatados com proliferação estromal no centro das papilas, onde havia múltiplas camadas de células epiteliais de pleomorfismo moderado a acentuado e nucléolos evidentes; e o carcinoma complexo (n=12) representado pela presença de células epiteliais malignas, e mioepiteliais, sem a observação de metaplasias e/ou matriz mixóide, semelhante aos adenomas complexos, diferenciando-se apenas pela elevada atipia celular e maior índice mitótico.

#### 5.1.1 Análise anatomopatológica dos tumores utilizados para o cultivo

Também foram submetidos a análise anatomopatológica os cinco tumores coletados para a realização do cultivo primário, tendo as cadelas apresentado uma variação de 5 a 13 anos, com média de 10,4 anos de idade, concordando com (DORN et al. 1968), sendo das raças: Poodle, dois animais; e Fox Paulistinha; Teckel e Pinscher, um espécime cada. Para classificar histologicamente os tumores, também foi utilizada a classificação de Cassali et al. (2011). Os casos analisados neste trabalho, bem como os submetidos ao cultivo celular, e suas classificações histológicas se encontram esquematizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos tipos histopatológicos de tumores da glândula mamária de cadelas (n=49), e de cinco amostras submetidas a cultivo celular, segundo classificação de Cassali et al. (2011)

| <b>Amostras</b>  | <b>Classificação</b>       | <b>Quantidade</b> |
|------------------|----------------------------|-------------------|
|                  | <b>Histopatológica</b>     |                   |
| <b>Benignos</b>  | Papiloma Ductal            | 2                 |
|                  | Adenoma Complexo           | 6                 |
|                  | Tumor Misto Benigno        | 13                |
| <b>Malignos</b>  | Carcinoma Tubular          | 1                 |
|                  | Carcinoma em Tumor Misto   | 5                 |
|                  | Carcinoma Papilar          | 10                |
|                  | Carcinoma Complexo         | 12                |
| <b>Cultivo 1</b> | Carcinoma Lobular          | 1                 |
| <b>Cultivo 2</b> | Carcinoma em Tumor Misto   | 1                 |
| <b>Cultivo 3</b> | Carcinoma em Tumor Misto   | 1                 |
| <b>Cultivo 4</b> | Carcinoma Papilar Invasivo | 1                 |
| <b>Cultivo 5</b> | Carcinoma Papilar não      | 1                 |
|                  | Invasivo                   |                   |

## 5.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS TMAS

### 5.2.1 Citoqueratina e Vimentina

A imunomarcção resultante do uso do anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3 nos tecidos de diferentes tipos histológicos de tumores mamários, mostrou maior escore nas células de origem epitelial das neoplasias malignas ( $p < 0,05$ ), como mostra a tabela 2. De acordo com Griffey et al. (1993), Gartner et al. (1999) e Zuccari et al. (2002), a citoqueratina AE1/AE3 e a vimentina são bons marcadores para diferenciar as células epiteliais basais e luminais, das células estromais em tumores mamários. Foi observada intensa marcação citoplasmática nas células epiteliais ductais e alveolares da glândula mamária. De acordo com Becker et al. (2007) e Hardy et al. (2007), a EMT é um

importante processo molecular para a progressão e a metástase tumoral, e tem como principal aspecto a perda da expressão de marcadores das proteínas epiteliais como as citoqueratinas. Esta relação com a EMT não foi observada no presente estudo, o qual demonstrou maior expressão das citoqueratinas AE1/AE3 em tumores malignos, que apresentam potencial metastático.

Outro aspecto da EMT é a maior expressão de marcadores mesenquimais, o que está relacionado ao fenótipo mais invasivo e de pior prognóstico em tumores de mama e de vesícula urinária em humanos (MOODY et al. 2005; BAUMGART et al. 2007). Em nossos ensaios realizados com o anticorpo anti-vimentina, utilizado para detectar células de origem mesenquimal, observamos intensa marcação citoplasmática em células fusiformes de arranjo em paliçada circundantes aos alvéolos e ductos mamários, condizentes com o mioepitélio e fibroblastos do parênquima mamário e não nas células neoplásicas demonstrando no haver relação com a EMT nestas neoplasias (Figura 7 a). Esta marcação apresentou maiores escores vistos nos tumores benignos ( $p < 0,05$ ), como mostra a tabela 2, mais especificamente nos casos classificados como adenomas complexos, corroborando com Sarli et al. (2004) e Gama, Alves e Schmitt (2010), que observaram frequente diminuição da expressão de citoqueratinas e consequente aumento da expressão da vimentina em tumores da glândula mamária, que apresentam maior proliferação estromal e vascular, como os tumores complexos.

### 5.2.2 ANTICORPO CD44

O CD44 como marcador putativo de CTTs, foi estudado pela importância da hipótese de que as Células Tronco Tumorais são responsáveis pela recorrência e metástase tumoral (REYA et al. 2001), e também pela limitada quantidade de estudos realizados utilizando este marcador em tumores de

mama caninos. O CD44 é uma importante molécula de adesão que interagindo com moléculas da matriz extracelular, ativa vias de proliferação e migração, tanto de células normais como de células neoplásicas.

Nas neoplasias mamárias estudadas, independente da classificação morfológica, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os escores dos tumores benignos e malignos (tabela 2). A positividade na reação de imuno-histoquímica ao anticorpo CD44 foi demonstrada pela afinidade intensa ao revelador (DAB) na membrana celular, particularmente em localização basal e lateral da membrana, localizações estas da respectiva molécula, descrito por Goldstein et al. (1989) e Wolny et al. (2010). Além desta localização, em raras células foi observada reação citoplasmática fracamente positiva, pelo fato do CD44 ter um pequeno domínio citoplasmático (WOLNY et al. 2010). A expressão do CD44 esteve predominantemente relacionada às células epiteliais ductais, e em menor grau com as células alveolares da glândula mamária. A expressão do CD44 nos outros componentes celulares das neoplasias analisadas foi de expressão reduzida ou nula, como a observada nas células mioepiteliais, fibroblastos e células endoteliais, semelhante aos achados de Alldinger et al. (1999) e Paltian et al. (2009).

A expressão dos anticorpos utilizados, e sua relação entre tumores benignos e malignos, se encontram especificados na Tabela 2.

Tabela 2 – Expressão dos anticorpos (citoqueratina, vimentina e CD44) em tumores benignos e malignos da glândula mamária de cadelas (n=49)

|               |        | Tipo de Tumor  |      |                |      |                  |
|---------------|--------|----------------|------|----------------|------|------------------|
| Anticorpo     | Escore | Benigno (n=21) |      | Maligno (n=28) |      | P <sup>(1)</sup> |
|               |        | n              | %    | n              | %    |                  |
| Citoqueratina | 1      | 3              | 14,3 | -              | -    | 0,0348           |
|               | 2      | 11             | 52,4 | 12             | 42,9 |                  |
|               | 3      | 7              | 33,3 | 14             | 50,0 |                  |
|               | 4      | -              | -    | 2              | 7,1  |                  |
| Vimentina     | 0      | 3              | 14,3 | 2              | 7,1  | 0,6061           |
|               | 1      | 10             | 47,6 | 19             | 67,9 |                  |
|               | 2      | 6              | 28,6 | 6              | 21,4 |                  |
|               | 3      | 2              | 9,5  | 1              | 3,6  |                  |
| CD44          | 0      | 6              | 28,6 | 2              | 7,1  | 0,0058           |
|               | 1      | 9              | 42,8 | 9              | 32,1 |                  |
|               | 2      | 5              | 23,8 | 8              | 28,6 |                  |
|               | 3      | 1              | 4,8  | 8              | 28,6 |                  |
|               | 4      | -              | -    | 1              | 3,6  |                  |

Teste de Mann-Whitney.

#### 5.2.2.1 Neoplasias Mamárias Benignas

Em relação a expressão positiva do CD44, em 76,9% (10/13) dos tumores mistos benignos analisados, a marcação das células epiteliais alveolares e ductais foi tênue ou nula, o mesmo ocorrendo no mioepitélio, células estromais e endotélio vascular. Nos demais 23,1% (3/13) dos mesmos tumores, foi observada intensa marcação nas células epiteliais neoplásicas dos alvéolos e ductos mamários. Reação de intensidade fraca também foi observada no tecido mamário adjacente livre da neoplasia. Foram classificados dois papilomas ductais, tendo um deles apenas um foco de proliferação epitelial com fraca marcação pelo CD44, sendo esta mais intensa no epitélio normal adjacente. O segundo já apresentava ductos distendidos com maior proliferação epitelial, onde houve marcação tanto quanto no tecido normal circunjacente. Das neoplasias benignas, os casos diagnosticados como adenomas complexos foram os que apresentaram maior intensidade e homogeneidade na expressão de CD44, tanto nas áreas neoplásicas quanto no epitélio normal, além de marcação em algumas células mioepiteliais. Em 19

adenomas complexos analisados por Paltian et al. (2009), também foi observada homogeneidade de expressão do CD44 em células epiteliais e mioepiteliais, sem diferença significativa entre áreas centrais e periféricas do tumor ( $p < 0,05$ ). Em humanos, estudos em neoplasias mamárias benignas demonstraram marcação de CD44 principalmente nas células epiteliais alveolares do tumor, porém também havendo expressão no tecido normal adjacente (BANKFALVI et al. 1998). Já Auvinen et al. (2005), não observaram expressão significativa nos tumores mamários benignos estudados em humanos.

A positividade na expressão do CD44 em tumores mamários caninos pode estar relacionada a maior interação das células epiteliais da mama ao ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular, porém a função desta proteína nas células neoplásicas mamárias caninas necessita de estudos mais detalhados.

#### 5.2.2.2 Neoplasias Mamárias Malignas

As neoplasias malignas apresentaram escores mais elevados se comparados aos tumores benignos ( $p < 0,05$ ). Estes resultados divergem dos obtidos por Paltian et al. (2009) que observaram elevada expressão de CD44 em células epiteliais de adenomas, comparada a expressão em carcinomas. O subtipo tubular foi o carcinoma que apresentou a maior expressão de marcação com escore 4, o que difere dos achados de Madrazo et al. (2009), que observaram maior expressão de CD44 em carcinomas complexos em relação aos tubulopapilíferos. Os carcinomas em tumor misto mostraram marcação discreta a moderada nas células neoplásicas, sendo a mesma intensidade observada nas células ductais normais em áreas adjacentes ao tumor. Foram classificados 10 carcinomas papilares, dos quais 40% (4/10) tiveram discreta

expressão do CD44 nas áreas carcinomatosas. Os demais 60% (6/10), no entanto, apresentaram imunoreatividade moderada a alta das células epiteliais em toda extensão de proliferação papilar maligna. O subtipo maligno de maior incidência foi o carcinoma complexo. Destes 41,7% (5/12) apresentaram maior expressão antigênica principalmente em áreas periféricas do tumor e, nos ductos de epitélio normal adjacente, mas em menor intensidade. Em 58,3% (7/12) dos carcinomas complexos, foi detectada de moderada a alta expressão imuno-histoquímica do CD44 apenas nas células epiteliais carcinomatosas, não havendo marcação de células mioepiteliais, constituintes desta neoplasia. Blacking et al. (2011) estudaram em cultivos de tumores caninos, a relação do CD44 com a proliferação celular, visto que células com baixa expressão de CD44 se encontravam na fase G1 do ciclo celular, em contraste aquelas que apresentavam alta expressão, portanto na fase G2 do ciclo, porém por ser uma expressão transitória, perderia a sua utilidade como marcador de CTTs. A diversidade de expressão deste antígeno entre os tumores benignos e malignos pode estar relacionada a diferentes taxas proliferativas que cada tipo de tumor apresenta, já que não foram observadas diferenças significativas entre os mesmos ( $p < 0,05$ ), aliado a expressão importante nos tecidos normais adjacentes aos tumores (BLACKING et al. 2011).

### 5.3 CULTIVO CELULAR

Linhagens de células provenientes de tumores mamários veem sendo muito utilizadas como modelos nos estudos de neoplasias da mama (VARGO-GOGOLA, ROSEN, 2007). Um dos objetivos deste trabalho foi o ensaio de cultivo de células tumorais, em particular as epiteliais de tumores mamários caninos, para que novos estudos pudessem ser desenvolvidos, utilizando-as como instrumento para pesquisas, já que poucas foram as linhagens

estabelecidas com sucesso (PEIXOTO, 2001). Dos cinco casos coletados para obtenção do cultivo celular, todos tiveram os explantes aderidos ao substrato, o que ocorreu após sete dias de cultura. Após esse período, as células liberadas dos explantes começaram a se aderir ao substrato e proliferar, porém em velocidades diferentes. O tempo para alcançar a confluência em uma garrafa de 25cm<sup>2</sup> para cada caso está especificado na Tabela 3. Estes cultivos se mantiveram com sucesso por aproximadamente dois meses, sendo então, as amostras congeladas a fim de dar continuidade ao trabalho.

Tabela 3 – Período de tempo, em dias, para que as células apresentassem confluência em garrafa para cultivo celular (25cm<sup>2</sup>), após os explantes estarem aderidos ao substrato

| <b>Carcinomas</b>                            | <b>Tempo (dias)</b> |
|----------------------------------------------|---------------------|
| <b>1. Lobular Pleomórfico <i>in situ</i></b> | 16                  |
| <b>2. Carcinoma em Tumor Misto</b>           | 14                  |
| <b>3. Carcinoma em Tumor Misto</b>           | 4                   |
| <b>4. Papilar Invasivo</b>                   | 7                   |
| <b>5. Papilar Não invasivo</b>               | 7                   |

As células epiteliais dependem da interação com as células do estroma para sua progressão e desenvolvimento. Esta interação é mediada por sinais de componentes da matriz extracelular (BHOWMICK et al. 2004). Por este motivo as células fibroblastóides eram retiradas pela tripsinização branda e, a cada troca de meio, era acrescido 1mL do meio à garrafa das células epitelioides. Segundo Lasfargues e Ozzello (1958), os componentes do estroma tecidual da mama se opõem à migração das células epiteliais em cultura, impedindo seu livre desenvolvimento. Porém mesmo depois de realizada a tripsinização branda, foram observados dois grupos celulares distintos. Em menor quantidade, foi identificada uma população de células maiores, arredondadas, apresentando vacúolos citoplasmáticos, com núcleos arredondados a ovais, muitas apresentando dois núcleos ou mais, nucléolos evidentes, por vezes múltiplos, assemelhando-se às células epiteliais com características de malignidade. O outro grupo de células apresentava-se em maior quantidade, e possuía morfologia fibroblastóide, com maior taxa de

proliferação, constituída por células alongadas, e que circundava os grupos celulares epitelióides, formando arquitetura semelhante a estrutura do parênquima mamário (Figura 6, a e b). Esta caracterização e os tipos celulares foram confirmados pelos ensaios imuno-histoquímicos, utilizando-se os anticorpos anti-citoqueratina e anti-vimentina, para identificar células de origem epitelial e de origem mesenquimal respectivamente. A tripsinização branda foi ineficiente de acordo com estes achados, conferindo a importância da aplicação de outros métodos para a separação das células epiteliais dos fibroblastos em cultivo celular.

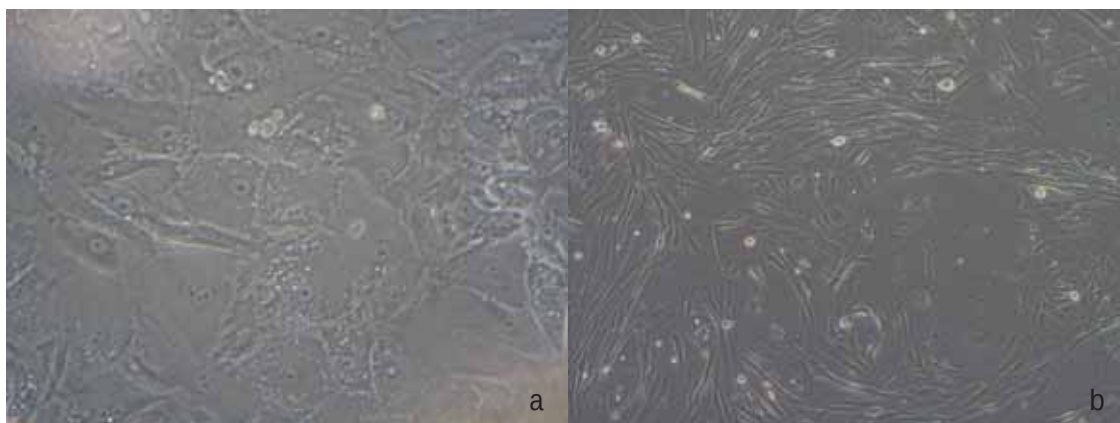


Figura 6 – Imagem de microscopia de luz invertida de carcinoma em tumor misto (a) evidenciando células epitelióides, com características de malignidade como pleomorfismo, binucleação nucléolos evidentes e múltiplos. Objetiva 40x. (b) aglomerados de células alongadas que se assemelham as células mesenquimais circundando grupos celulares de morfologia epitelióide, formando arquitetura semelhante a do parênquima mamário. Objetiva 10x.

### 5.3.1 Análise Imuno-histoquímica dos Cultivos Celulares

Para cada amostra utilizada foram realizados ensaios imuno-histoquímicos para os anticorpos anti-citoqueratina, anti-vimentina e anti-CD44 nos cortes histológicos das peças cirúrgicas, nas citoinclusões coletadas por PAAF dos fragmentos tumorais e dos *pellets* formados pelas células cultivadas, para analisar o comportamento destas após submetê-las ao cultivo.

#### 5.3.1.1 Análise imuno-histoquímica das neoplasias que originaram os cultivos

No carcinoma lobular, foi observada intensa marcação para anti-citoqueratina, principalmente onde havia acentuada proliferação maligna. A imunoreatividade da vimentina foi menor, quando comparada à citoqueratina, e restrita às áreas do estroma localizadas ao redor dos lóbulos. Houve expressão do CD44 nos ductos mamários do tecido da mama íntegro adjacente, porém com intensidade de marcação reduzida nas áreas carcinomatosas. Achados estes, condizentes com Paltian et al. (2009), que não observaram diferença significativa de marcação pelo CD44 entre áreas tumorais e tecido normal mamário adjacente nos carcinomas simples, indicando que o CD44 não tem papel importante nestes tumores como observado em tumores mamários humanos.

Dois carcinomas em tumores mistos foram analisados; um deles apresentou maior proliferação de células epiteliais identificadas pelo maior escore obtido na imunoreação à citoqueratina, comparando-se ao da vimentina. Neste caso houve intensa marcação de CD44 nas células epiteliais neoplásicas por toda a extensão do tumor, além de reação fraca nos fibrócitos estromais. Já no segundo caso, foi observada menor proliferação epitelial, confirmada pelo menor escore pela citoqueratina em relação ao maior exibido na reação com a vimentina. A expressão do CD44 também foi fraca, porém mais evidente em células epiteliais alveolares e ductais. No carcinoma em tumor misto esta diferença na imunorreação ao CD44 pode ser devido a variabilidade de focos de células epiteliais carcinomatosas presente em cada um dos tumores, já que estes tipos de carcinomas podem exibir desde um pequeno nódulo de células epiteliais com elevado pleomorfismo, até a invasão e substituição completa da lesão benigna pré-existente (CASSALI et al. 2011).

O carcinoma papilar invasor, por ter áreas de invasão estromal mais evidentes, apresentou maior marcação pela vimentina. Poucos grupos de

células epiteliais neoplásicas tiveram marcação intensa pelo CD44, e raras células alongadas do estroma exibiram fraca marcação citoplasmática. Já no carcinoma papilar não invasivo, a expressão de vimentina apresentou-se semelhante a da citoqueratina, porém um escore maior de expressão de CD44 esteve presente no carcinoma papilar invasivo. Esta marcação foi observada por toda a área de proliferação papilar maligna. De acordo com Paltian et al. (2009) a menor expressão do anticorpo CD44 em tumores mamários de cadelas, pode estar relacionado ao maior potencial metastático da neoplasia, justificando a diferença observada entre os dois carcinomas papilares (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado das análises imuno-histoquímicas realizadas nas peças cirúrgicas dos tumores

| Amostras histopatológicas          | citoqueratina | vimentina | CD44 |
|------------------------------------|---------------|-----------|------|
| Lobular Pleomórfico <i>in situ</i> | +++           | ++        | +    |
| Carcinoma em Tumor Misto           | +++           | ++        | +++  |
| Carcinoma em Tumor Misto           | ++            | +++       | +    |
| Papilar Invasivo                   | ++            | +++       | +    |
| Papilar Não invasivo               | ++            | ++        | ++   |

#### 5.3.1.2 Análise das citoinclusões das PAAF's

As citoinclusões obtidas de PAAF são ferramentas úteis no diagnóstico pré-terapêutico, e no monitoramento da progressão de neoplasias mamárias (BRIFFOD et al. 2000). Tais amostras fornecem material de alta celularidade, representativo da lesão que pode ser utilizado para a realização de ensaios imuno-histoquímicos (BOZZETTI et al. 1994).

A citoinclusão do carcinoma lobular mostrou reduzida celularidade, porém suficiente na visualização da imunomarcação máxima pela citoqueratina. Neste caso a imunoreatividade tanto pela vimentina quanto pelo

CD44 foi nula. A citoinclusão do caso 1 de carcinoma em tumor misto apresentou celularidade ótima, caracterizada por células arredondadas de pleomorfismo moderado, relação núcleo/citoplasma aumentada e nucléolos evidentes, além da presença de células alongadas. Nas células arredondadas a marcação pela citoqueratina foi intensa e as células alongadas mostraram marcação pela vimentina. O CD44 foi positivo, particularmente na membrana de células epiteliais (Figura 7 b, c, d). O carcinoma em tumor misto identificado como caso 3 apresentou população de células arredondadas, com pleomorfismo moderado, cromatina frouxa, nucléolos evidentes e por vezes múltiplos. Neste exemplar também haviam células alongadas com pleomorfismo baixo a moderado e nucléolos evidentes. A marcação de citoqueratina foi intensa, de vimentina moderada, e as membranas das células epiteliais fortemente marcadas pelo CD44.

Na citoinclusão do carcinoma papilar invasor pudemos observar grupos de células arredondadas apresentando de baixo a moderado pleomorfismo circundados por elevada quantidade de células alongadas. A citoqueratina e a vimentina tiveram expressão semelhante, sendo a citoqueratina positiva nas células arredondadas e a vimentina nas células alongadas. A reação do CD44 nas células epiteliais foi discreta.

O carcinoma papilar não invasivo apresentou padrão semelhante ao invasivo, porém os grupos de células epiteliais circundadas por escassa quantidade de células alongadas, possuíam arquitetura semelhante a pseudopapilas. A imuno-histoquímica mostrou marcação intensa pela citoqueratina, expressando positividade à vimentina nas células fusiformes marginais. A expressão de CD44 nas células epiteliais foi mais intensa comparado a variante invasiva. Comparando-se os ensaios de imuno-histoquímicas dos cortes histológicos com as de citoinclusões foi observado similaridade entre ambos, no que se refere à recuperação de material suficiente e de qualidade. Apenas em um dos espécimes onde a expressão do CD44 foi mais intensa na citoinclusão. Este resultado provavelmente se deve à maior quantidade de células epiteliais, em comparação às mesenquimais, presentes

nas citoinclusões, já que apenas as células epiteliais tiveram forte marcação pelo anticorpo (Tabela 4). As citoinclusões obtidas por PAAF foram de fácil obtenção e baixo custo, fornecendo quantidade de material suficiente para a realização de ensaios imuno-histoquímicos, resultados estes, também obtidos por Briffod et al. (2000) e Delgallo et al. (2010), que realizaram imuno-histoquímicas de citoinclusões de PAAF de tumores mamários humanos, mostrando que este método pode ser utilizado na identificação e caracterização de carcinomas mamários por meio de marcadores antigênicos.

Estudos anteriores demonstraram que, para a utilização da imuno-histoquímica, a citoinclusão se mostra mais vantajosa que esfregaços, pelo procedimento ser o mesmo empregado em cortes histológicos, facilitando a sua interpretação; pela menor quantidade de artefatos encontrados nas lâminas; pela diminuição de falso-positivos; e pela possibilidade do uso de vários marcadores, já que múltiplos cortes podem ser retirados de um único bloco (BRIFFOD et al. 2000; BRIFFOD et al. 2001; BUENO, 2007). No presente estudo foi possível a utilização de três marcadores distintos, apresentando lâminas de boa qualidade e sem fundo excessivo, equivalente aos achados dos autores citados, que avaliaram receptores hormonais em carcinomas mamários humanos.

A citoinclusão se mostrou um método diagnóstico complementar fornecendo meios para análises mais detalhadas dos espécimes, podendo ser utilizado como exame diagnóstico na oncologia veterinária, corroborando com achado de estudo anterior, em neoplasias de cães e gatos (PAIVA et al. 2011).

Tabela 4 –Resultados das análises imuno-histoquímicas realizadas nas citoinclusões obtidas a partir das PAAF's

| Amostras das PAAF                  | citoqueratina | vimentina | CD44 |
|------------------------------------|---------------|-----------|------|
| Lobular Pleomórfico <i>in situ</i> | +++           | -         | -    |
| Carcinoma em Tumor Misto           | +++           | ++        | ++   |
| Carcinoma em Tumor Misto           | +++           | ++        | +++  |
| Papilar Invasivo                   | ++            | ++        | +    |
| Papilar Não invasivo               | +++           | +         | ++   |

#### 5.3.1.3 Análise Morfológica e Imunocitoquímica das Células Cultivadas

A técnica de imunocitoquímica convencional em células de cultivos é realizada na própria garrafa onde as mesmas estão condicionadas (FRESHNEY, 2005). A técnica apresentada neste estudo mostrou-se eficiente e de menor custo, perdendo-se apenas a arquitetura estabelecida nos cultivos celulares, e o formato alongado dos fibroblastos. A imunomarcagem das células de cultivo do carcinoma lobular apresentou positividade moderada para citoqueratina, e intensa para vimentina e CD44. Morfologicamente mostrou binucleação e anisocariose mais evidente na análise histopatológica. O caso 1 de carcinoma em tumor misto, durante o cultivo já estabelecido, apresentou células de elevado pleomorfismo, com cromatina frouxa e nucléolos evidentes, por vezes múltiplos. Tais células possuíam vacúolos citoplasmáticos, porém raras exibiam-se binucleadas. Neste caso a expressão para citoqueratina, vimentina e CD44 foi acentuada, moderada e ausente respectivamente (Figura 7 e, f). O segundo caso de carcinoma em tumor misto mostrou à microscopia células arredondadas com núcleos alongados a arredondados, cromatina densa, raras binucleações e vacúolos citoplasmáticos. A análise das

imunomarcações para citoqueratina foi discreta e nula para CD44, porém a expressão da vimentina foi máxima.

O carcinoma papilar invasivo apresentou células com pleomorfismo aumentado à histologia, apresentando positividade moderada a acentuada para citoqueratina e vimentina, e ausente para CD44. O carcinoma papilar não invasivo também revelou grau de pleomorfismo elevado com acentuada quantidade de mitoses. O padrão na expressão de citoqueratina e vimentina foi idêntico ao tipo invasivo, diferindo apenas na fraca positividade ao CD44.

Em todos os cultivos realizados foi observada proliferação abundante de fibroblastos, traduzido pela expressão contínua da vimentina nas citoinclusões do cultivo. A expressão do CD44 se mostrou fraca ou nula na maioria dos cultivos, sendo evidente em apenas um dos casos (Tabela 5). Esses resultados provavelmente se devem a uma maior diferenciação ou até mesmo a redução da taxa de proliferação nas células cultivadas após dois a três repiques, pois a menor expressão de CD44 sugere que as células estejam fora do ciclo celular ou em fase G1, como descrito por Blacking et al. (2011).

Tabela 5 – Resultados das análises imuno-histoquímicas realizadas nas amostras das células cultivadas

| Cultivo                               | citoqueratina | vimentina | CD44 |
|---------------------------------------|---------------|-----------|------|
| Lobular Pleomórfico<br><i>in situ</i> | ++            | +++       | ++   |
| Carcinoma em Tumor<br>Misto           | +++           | ++        | -    |
| Carcinoma em Tumor<br>Misto           | +             | +++       | -    |
| Papilar Invasivo                      | ++            | +++       | -    |
| Papilar Não invasivo                  | ++            | +++       | +    |

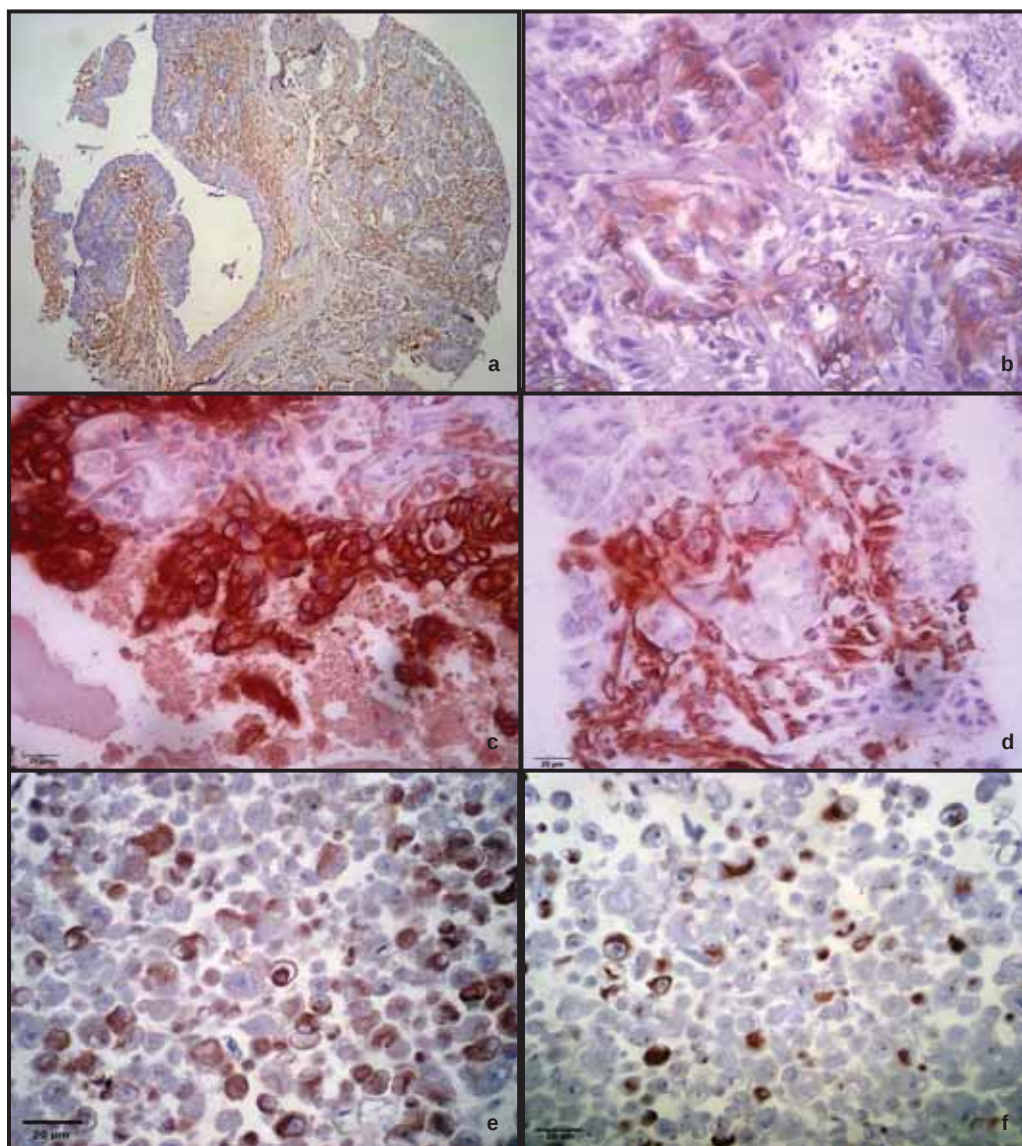


Figura 7 – a) Fotomicrografia de amostra de TMA apresentando imunomarcação positiva para o anticorpo anti-vimentina. Objetiva 4x. Fotomicrografias de carcinoma em tumor misto de citoinclusões obtidas por PAAF, (b) imunomarcação positiva pelo CD44 em células epiteliais, (c) intensa marcação a citoqueratina nos grupos de células epiteliais, (d) marcação positiva para vimentina. Objetiva 40x. Imunomarcação da citoinclusão obtida a partir de cultivo de carcinoma em tumor misto, (e) marcação intensa a citoqueratina, (f) moderada marcação a vimentina no citoplasma de células que perderam sua morfologia fusiforme. Objetiva 40x.

#### 5.4 EXPRESSÃO DA TELOMERASE

A expressão de telomerase foi observada nas cinco amostras de células tumorais cultivadas provenientes de neoplasias mamárias caninas (Figura 8), porém não houve diferença significativa comparando-se ao grupo controle que também demonstrou sua expressão ( $p=0,407$ ). Estes resultados discordam com Funakoshi et al. (2000), que referiram ausência da atividade da telomerase em amostras de tecido mamário normal e hiperplásico de cadelas, analisadas por imuno-histoquímica. Porém os resultados aqui obtidos concordam com estudos recentes realizados por Panarese et al. (2006), que detectaram a telomerase em tecidos mamários normais e em mastopatias fibrocísticas, utilizando dois métodos distintos de análise. Da mesma forma, por meio de RT-PCR foi detectado a expressão de telomerase em 50% dos tecidos mamários saudáveis e em 88% dos tecidos mamários adjacentes ao tumor, porém livres da neoplasia (ZAVLARIS et al. 2009). Em humanos a telomerase não é expressa na maioria dos tecidos adultos normais, sendo observada apenas em células com elevado potencial proliferativo como células germinativas, linfócitos ativos, células tronco adultas e fibroblastos que estão na fase S do ciclo celular (BROCCOLI et al. 1995; HIYAMA et al. 1995; MASUTOMI et al. 2003). Esta expressão em tecidos normais tanto de cães quanto em humanos provavelmente está relacionada a populações de células mitoticamente ativas, e não com as CTTs dos carcinomas mamários (NASIR, 2008).

Apesar de escassos os estudos em tumores mamários caninos relativos a telomerase, já foi observado que esta enzima está presente em mais de 90% dos tumores caninos analisados (ARGYLE, NASIR, 2003; FUNAKOSHI et al., 2000; NASIR et al., 2001; YAZAWA et al., 1999). Estes resultados corroboram com os do presente estudo onde observamos expressão da telomerase em 100% dos tumores malignos analisados, porém este parâmetro não deve estar relacionado com a malignidade, já que tecidos mamários normais também apresentaram expressão significativa.

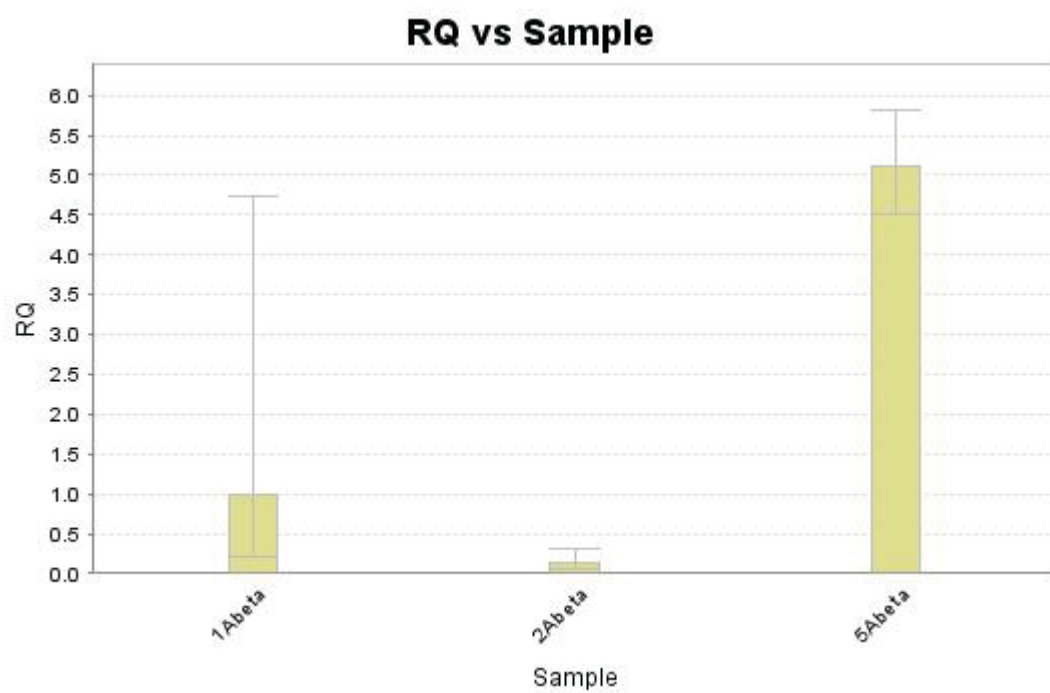


Figura 8 – Gráfico mostrando o  $\Delta\Delta Ct$  das amostras onde foram analisadas as expressões de  $\beta$ -actina e da telomerase dos tumores mamários caninos submetidos a cultivo celular.

---

## CONCLUSÕES

## 6 CONCLUSÕES

1. A expressão do CD44 foi maior em tumores malignos que possuem maior potencial proliferativo e metastático, porém por sua marcação ter apresentado variações entre tumores de mesma classificação histológica, e por ter sido expresso igualmente em áreas de tecido mamário normal adjacente a neoplasia, a sua utilidade como marcador de CTTs em neoplasias mamárias caninas ainda necessita de estudos mais detalhados. Também apresentou maior marcação em células que expressaram proteínas de origem epitelial, mostrando não ter relação com a EMT nesses tumores caninos.
2. A expressão da telomerase foi observada em todos os tumores malignos analisados, porém a sua relação com a malignidade e com as CTTs não pôde ser afirmada, pois os tecidos normais da glândula mamária também apresentaram sua expressão.
3. As técnicas de *Tissue MicroArrays* e da imunocitoquímica em células cultivadas, mostraram-se eficientes e de menor custo, podendo assim serem adotadas tanto para exames de rotina como na área da pesquisa.
4. O cultivo primário e o estabelecimento de linhagens imortalizadas de células tumorais exibem diversas limitações, em particular, a instabilidade das células em cultivo. Embora existam dificuldades para a obtenção de linhagens celulares estáveis, o presente estudo constituiu um passo inicial para a realização de futuros estudos *in vitro*, utilizando tecidos neoplásicos da glândula mamária canina. Estas dificuldades poderão ser superadas, e novos resultados a partir destes, poderão aprimorar os diagnósticos e tratamentos para os tumores mamários.

## REFERÊNCIAS

- ALI, H.R.; DAWSON, S.J.; BLOWS, F.M.; PROVENZANO, E.; PHRAROAH, P.D.; CALDAS, C. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. **Breast Cancer Research**. v.13, R118, 2011.
- AL-HAJJ, M.; CLARKE, M.F. Self-renewal and solid tumor stem cells. **Nature Oncogene**. v. 23, p. 7274-7282, 2004.
- AL-HAJJ, M.; WICHA, M.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** v. 100, p. 3983-3988, 2003.
- ALLDINGER, S.; BAUMGARTNER, W.; KREMMER, E.; FONFARA, S. Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 46, p. 19-32, 1999.
- ARGYLE, D.J.; NASIR, L. Telomerase: A potencial diagnostic and therapeutic tool in canine oncology. **Veterinary Pathology**. v. 40, p. 1-7, 2003.
- ARTANDI, S.E.; ALSON, S.; TIETZE, M.K.; SHARPLESS, N.E.; GREENBERG, R.A.; CASTRILLON, D.H.; HORNER, J.W.; WEILER, S.R.; CARRASCO, R.D.; DEPINHO, R.A. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 99, p. 8191-8196, 2002.
- AUVINEN, P.; TAMMI, R.; TAMMI, M.; JOHANSSON, R.; KOSMA, V-M. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. **Histopathology** v. 47, p. 420-428, 2005.
- AVILION, A.A.; PIATYSZEK, M.A.; GUPTA, J.; SHAY, J.W.; BACCHETTI, S.; GREIDER, C.W. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissue. **Cancer Research**. v. 56, p. 645-650, 1996.
- BANKFALVI, A.; TERPE, H-J.; BREUKELMANN, D.; BIER, B.; REMPE, D. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumour progression. **Histopathology**. v. 33, p.107-116, 1998.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole LTDA, 1991, 629p.
- BAUMGART, E.; COHEN, M.S.; SILVA, N.B.; JACOBS, M.A.; WOTKOWICZ, C.; RIEGER-CHRIST, K.M.; BIOLO, A.; ZEHEB, R.; LODA, M.; LIBERTINO, J.A. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. **Clinical Cancer Research**. v.13, p. 1685–1694, 2007.
- BECKER, K.F.; ROSIVATZ, E.; BLECHSCHMIDT, K.; KREMMER, E.; SARBIA, M.; HOFER, H. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. **Cells Tissues Organs** v. 185 p. 204–212, 2007.

BHOWMICK, N.A.; NEILSON, E.G.; MOSES, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**. v. 432, n.7015, p.332-337, 2004.

BLACKING, T.M.; WATERFALL, M.; ARGYLE, D.J. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.141, p. 46-57, 2011.

BORLAND, G.; ROSS, J.; GUY, K. Forms and functions of CD44. **Immunology**, v. 93, p. 139-148, 1998.

BOSTOCK, D.E. Canine and feline mammary neoplasms. **British Veterinary Journal**, v. 142, p. 506-515, 1986.

BOTELLHO, C.R. **Estudo histológico, imuno-histoquímico e de cultura de células de tecidos normais e cancerosos da mama humana e canina**. 2009. 68 f. Dissertação (mestrado em Biologia Animal) – Faculdade de Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BOZZETTI, C.; NIZZOLI, R.; NALDI, N.; MANOTTI, L.; SAVOLDI, L.; CAMISA, R.; GUAZZI, A.; COCCONI, G. Fine-needle aspiration technique for the concurrent immunocytochemical evaluation of multiple biologic parameters in primary breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 32, p. 221-228, 1994.

BRIFFOD, M.; Le DOUSSAL, V.; SPYRATOS, F. Immunohistochemical determination of hormonal receptors on cell-blocks from fine-needle cytopunctures of breast carcinoma. **Bulletin du Cancer**. v. 88, p. 1028-1035, 2001.

BRIFFOD, M.; HACENE, K.; Le DOUSSAL, V. Immunohistochemistry on Cell blocks from fine-needle cytopuncture of primary breast carcinomas and lymph node metastases. **Modern Pathology**. v.13, n. 8, p. 841-850, 2000.

BROCCOLI, D.; YOUNG, J.W.; LANGE, T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. **Proceedings of the National Academy of Science**. v. 92, p. 9082-9086, 1995.

BRODEY, R.S.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ROSZEL, J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.19, p. 61–90, 1983.

BRONDEN, L.B.; NIELSEN, S.S.; TOFT, N.; KRISTENSEN, A.T. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. **Veterinary Record**. v. 166, p.586–590, 2010.

BUENO, S.P. **Estudo comparativo morfológico e imunoistoquímico entre citoinclusão e espécime cirúrgico de carcinoma primário da mama**. 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; De NARDI, A.B.; FERREIRA, E. BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brasilian Journal of Veterinary Pathology**. v.4, n.2, p. 153-180, 2011.

CLARKE, M.F.; DICK, J.E.; DIRKS, P.B.; EAVES, C.J.; JAMIESON, C.H.; 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.

COLLINS, A.T.; BERRY, P.A.; HYDE, C.; STOWER, M.J.; MAITLAND, N.J.; Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Research**. v. 65, p. 10946–10951, 2005.

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

DALERBA, P.; DYLLA, S.J.; PARK, I.K.; LIU, R.; WANG, X.; CHO, R.W.; HOEY, T.; GURNEY, A.; HUANG, E.H.; SIMEONE, D.M.; SHELTON, A.A.; PARMIANI, G.; CASTELLI, C.; CLARKE, M.F.; Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 104, p. 10158–10163, 2007.

DAY, A.J.; DE LA MOTTE, C.A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? **Trends in Immunology**. v.26, p. 637–643, 2005.

DELGALLO, W.D.; RODRIGUES, J.R.P.; BUENO, S.P.; VIERO, R.M.; SOARES, C.T. Cell blocks allow reliable evaluation of expression of basal (CK5/6) and luminal (CK8/18) cytokeratins and smooth muscle actin (SMA) in breast carcinomas. **Cytophatology**. v.21, p. 259-266, 2010.

DORN, C.R.; TAYLOR, D.O.; SCHNEIDER, R.; HIBBARD, H.H.; KLAUBER, M.R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California, II: cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. **Journal of the Natural Cancer Institute**. v. 40, p. 307–318, 1968.

DUCREST, A.L.; AMACKER, M.; MATHIEU, Y.D.; CUTHBERT, A.P.; TROTT, D.A.; NEWBOLD, R.F.; NABHOLZ, M.; LINGNER, J. Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. **Cancer Research**. v. 61, p. 7594-7602, 2001.

FEINBERG, A. A genetic approach to cancer epigenetics. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 70, p. 335-341, 2005.

FILLMORE, C.M.; KUPERWASSER, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. **Breast Cancer Reserch**. v. 10, R25, p. 1-13, 2008.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: manual of basic techniques**. 5 ed. New Jersey. Wiley-Liss, 2005, 577p.

FUNAKOSHI, Y.; NAKAYAMA, H.; UETSUKA, K.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; DOI, K. Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. **Veterinary Pathology**. v. 37, p. 177-183, 2000.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. **Veterinary Journal**. v. 184, p.45–51, 2010.

GARTNER, F.; GERALDES, M.; CASSALI, G. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumors: putative evidence for a common histogenesis. **Veterinary Journal**. v.158, p. 39-47, 1999.

GINESTIER, C.; HUR, M.H.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; MONVILLE, F.; DUTCHER, J.; BROWN, M.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; KLEER, C.G.; 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. 1, n.5, p. 555-567, 2007.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S.; SMELSTOYS, J.A. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: **Pathobiology of The Aging Dog**, ed. Mohr U, pp. 168–178. Iowa State University Press, Ames, IA, 2001.

GOLDSCHMIDT, M.H., PENA, L., RASOTTO, R., ZAPPULLI, V. : *Classification and Grading of Canine Mammary Tumors*. **Veterinary Pathology**. v. 48, p.117-131, 2011.

GOLDSTEIN, L.A.; ZHOU, D.F.H.; PICKER, L.J.; MINTY, C.N.; BARGATZE, R.F. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. **Cell**. v. 56, p.1063-1072, 1989.

GOODISON, S.; TARIN, D. Current status of CD44 variant isoforms as cancer diagnostic markers. **Histopathology**, v.32, P. 1-6, 1998.

GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R.; DAIRKEE, S.H. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. **Veterinary Pathology**. v. 30, p. 155-61, 1993.

HARDY, R.G.; VICENTE-DUENAS, C.; GONZALES-HERRERO, I.; ANDERSON, C.; FLORES, T.; HUGHES, S.; TSELEPIS, C.; ROSS, J.A.; SANCHEZ-GARCIA, I. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis. **American Journal of Pathology** v. 171, p. 1037–1046, 2007.

HELLEMEN, E.; BERGSTROM, R.; HOLMBERG, L. Prognostic factors in canine mammary gland tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**. v. 30, p. 20–27, 1993.

HERRERA-GAYOL, A.; JOTHY, S. CD44 modulates Hs578T human breast cancer cell adhesion, migration, and invasiveness. **Experimental and Molecular Pathology**. v.66, p. 99–108, 1999.

HILL, R.P.; PERRIS, R. “Destemming” cancer stem cells. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 99, p. 1435-1440, 2007.

HIYAMA, K.; HIRAI, Y.; KYOIZUMI, S.; AKIYAMA, M.; HIYAMA, E.; PIATYSZEK, M.A.; SHAY, J.W.; ISHIOKA, S.; YAMAKIDO, M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. **Journal of Immunology**. v. 155, p. 3711-3715, 1995.

JANDA, E.; NEVOLO, M.; LEHMANN, K.; DOWNWARD, J.; BEUG, H.; GRIECO, M. TGF- $\beta$  dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. **Oncogene**. v. 25, p. 7117-7130, 2006.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M.J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**. v. 4, p. 844–847, 1998.

KORSCHING, E.; PACKEISEN, J.; LIEDTKE, C.; HUNGERMANN, D.; WULFING, P.; van DIEST, P.J.; BRANDT, B.; BOECKER, W.; BUERGER, H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? **Journal of Pathology**. v. 206, p. 451–457, 2005.

LASFARGUES, E.; OZZELLO, L. Cultivation of human breast carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**. , v. 21, p. 1131-1147, 1958.

LAURENT, U.; FRASER, J.; ENGSTRÖM-LAURENT, A.; REED, R.; DAHL, L.; LAURENT, T. Catabolism of hyaluronan in the knee joint of the rabbit. **Matrix**, v. 12, p. 130-136, 1992.

LEE, H.W.; BLASCO, M.A.; GOTTLIEB, G.J.; HORNER, J.W.<sup>2ND</sup>; GREIDER, C.W.; DEPINHO, R.A. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. **Nature**. v. 392, p. 569-574, 1998.

LEWIN, B. Oncogenes and Cancer. **Genes VI**. New York: Oxford University, p.1131-1172, 1996.

LI, X.; LEWIS, M.T.; HUANG, J.; GUTIERREZ, C.; OSBORNE, C.K.; WU, M.F.; HILSENBECK, S.G.; PAVLICK, A.; ZHANG, X.; CHAMNESS, G.C.; WONG, H.; ROSEN, J.; CHANG, J.C. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v.100, p. 672-679, 2008.

LIU, R.; WANG, X.; CHEN, G.Y.; DALERBA, P.; GURNEY, A.; HOEY, T.; SHERLOCK, G.; LEWICKI, J.; SHEDDEN, K.; CLARKE, M.F. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. **The New England Journal of Medicine**. v. 356, n.3, p. 217-226, 2007.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. **Methods**. v. 25, p.402-8, 2001.

LOPES, A.; IYEYASU, H. LOPEZ, L.F., CASTRO, R.M., ALMEIDA, E.S. **Oncologia para graduação**. 1.ed. São Paulo: Tecmed, p. 515-520, 2005.

MADEWELL, B.R.; THEILEN, G.H. Tumors of the mammary gland. In: **Veterinary Cancer Medicine** Lea & Febiger, Philadelphia, p. 327-44. 1987.

MADRAZO, J.; GARCÍA-FERNANDEZ, R.A.; GARCÍA-IGLESIAS, M.J.; DURÁN, A.J.; ESPINOSA, J.; PÉREZ-MARTINEZ, C. The role of CD44 adhesion factor in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**. v. 180, p. 371-376, 2009.

MANI, S.A.; GUO, W.; LIAO, M.J.; EATON, E.N.; AYYANAN, A.; ZHOU, A.Y.; BROOKS, M.; REINHARD, F.; ZHANG, C.C.; SHIPITSIN, M.; CAMPBELL, L.L.; POLYAK, K.; BRISKEN, C.; YANG, J.; WEINBERG, R.A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v.133, p. 704-715, 2008.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 38-42, 2002.

MASUTOMI, K.; YU, E.Y.; KHURTS, S.; BEN-PORATH, I.; CURRIER, J.L.; METZ, G.B.; BROOKS, M.W. KANEKO, S.; MURAKAMI, S.; DeCAPRIO, J.A.; WEINBERG, R.A.; STEWART, S.A.; HAHN, W.C. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. **Cell**. v. 114, p. 241-253, 2003.

MATOS, A.J.F.; BAPTISTA, C.S.; GÄRTNER, M.F.; RUTTEMAN, G.R. Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: The need for standardized procedures. **The Veterinary Journal**. United Kingdom, Available online 30 Jan, 2012. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/tvjl](http://www.elsevier.com/locate/tvjl)>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2012.

MAY, C.D.; SPHYRIS, N.; EVANS, K.W.; WERDEN, S.J.; GUO, W.; MANI, S.A. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. **Breast Cancer Research**. v.13, n. 202, p. 1-10, 2011.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. Iowa: ed. Iowa State Press. 4 ed. 2002. 792p.

MCATTEER, J.A.; DAVIS, J. Basic cell culture technique and maintenance of cell lines. In: DAVIS, J.M. **Basic Cell Culture: A practical Approach**. New York, Oxford University, p.149-180, 1996.

MCDONALD, C. Primary culture and establishment of cell line. In: DAVIS, J.M. **Basic Cell Culture: A practical Approach**. New York, Oxford University, p.149-180, 1996.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMEN, E. LIPSCOMP, T.P. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.** In: WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2nd series, v. 7, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC. 1999.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement.** v. 57, p, 439–443, 2001.

MOODY, S.E.; PEREZ, D.; PAN, T.C.; SARKISIAN, C.J.; PORTOCARRERO, C.P.; STERNER, C.J.; NOTORFRANCESCO, K.L.; CARDIFF, R.D.; CHODOSH, L.A. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. **Cancer Cell.** v. 8, p. 197–209, 2005.

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, e 2888, 2008.

MOTTOLESE, 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** , v. 71, p. 182-187,1994.

NAKAMURA,T.M.; MORIN, G.B.; CHAPMAN, K.B.; WEINRICH, S.L.;ANDREWS, W.H.; LINGNER, J.; HARLEY, C.B.; CECH, T.R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. **Science.** v. 277, p. 955-959, 1997.

NASIR, L.; DELVIN, P.; McKEVITT, T.; RUTTERMAN, G.; ARGYLE,D.J. Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potencial model system to study human telomere and telomerase biology. **Neoplasia.** v. 3, p.351-359, 2001.

NASIR, L.; GAULT, E.; CAMPBELL, S.; VEERAMALAI, M.; GILBERT, D.; MCFARLANE, R.; MUNRO, A.; ARGYLE, D.J. Isolation and expression of the reverse transcriptase component of the *Canis familiaris* telomerase ribonucleoprotein (dogTERT). **Gene.** v. 336, p. 105-113, 2004.

NASIR,L. Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs. **Veterinary Journal.** v. 175, p.55-163, 2008.

NOWAK, M.; MADEJ, J.A.; DZIEGIEL, P.; DZIMIRA, S. Immunohistochemical localization of telomerase in mammary Adenocarcinoma in bitches. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.** v. 52, p. 113-117, 2008.

NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science** v. 194, p. 23–28, 1976.

ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. **European Journal of Cancer** v. 46, n.7, p. 1271-1277, 2010.

OWEN, L.N. TNM classification of tumours in domestic animals. **World Health Organization.** v. 1, p53, 1980.

PAIVA, M.B.; GOUVEIA, G.M.; BESERRA, H.H.O.; MADALENA, J.F.; LUVIZOTTO, M.C.R. Utilização do método de citoinclusão no diagnóstico de neoplasias em medicina veterinária. In: XV ENAPAVE, 2011, Goiânia. **Anais do XV ENAPAVE**, 2011.

PALTIAN, V.; ALLDINGER, S.; BAUMGARTNER, W.; WOHLSEIN, P. Expression of CD44 in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**. v. 141, p. 237-247, 2009.

PANARESE, S.; VRUNETTI, B.; SARLI, G. Evaluation of telomerase in canine mammary tissues by immunohistochemical analysis and a polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 18, p. 362-368, 2006.

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.

PANG, L.Y.; ARGYLE, D.J. Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology. **The Veterinary Journal**. v. 185, p. 15-22, 2010.

PANG, L.Y.; CERVANTES-ARIA, A.; ELSE, R.W.; ARGYLE, D.J. Canine mammary cancer stem cells are radio and chemoresistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. **Cancers**. v. 3, p. 1744-1762, 2011.

PARDA, L. R., CLARKE, M.F., MORRISON, S.J. Applying the Principles of Stem Cell Biology to Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.895-902, 2003.

PEI, X.F.; NOBLE, M.S.; DAVOLI, M.A.; ROSFJORD, E.; TILLI, M.T.; FURTH, P.A.; RUSSEL, R.; JOHNSON, M.D.; DICKSON, R.B. Explant-cell culture of primary mammary tumors from *MMTV-c-Myc* transgenic mice. **In vitro Cellular & Developmental Biology**. v. 40, p. 14-21, 2004.

PEIXOTO, E.B.M.I. **Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de tumores primários da mama**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biologia)-Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 43p, 2001.

PHILLIPS, T.M.; MCBRIDE, W.H.; PAJONK, F. The response of CD24(-/low)/CD44+breast cancer-initiating cells to radiation. **Journal of National Cancer Institute** v. 98, n. 24, p. 1777-1785, 2006.

PIRES, A. R. C., ANDREIUOLO, F. M., SOUZA, S. R. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. **Diagnostic Pathology**, v.1, n.14, p. 1-5, 2006.

POLYAK, K.; WEINBERG, R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v.9, p. 265-273, 2009.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.4, n.1, p. 33-45, 2003.

PRIESTER, W.A.; MANTEL, N. Occurrence of tumors in domestic animals: data from 12 United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine. **Journal of National Cancer Institute**. v. 47, p.1333–1344, 1971.

PRINCE, M.E.; SIVANANDAN, R.; KACZOROWSKI, A.; WOLF, G.T.; KAPLAN, M.J.; DALERBA, P.; WEISSMAN, I.L.; CLARKE, M.F.; AILLES, L.E. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, p. 973–978, 2007.

PURE´, E.; CUFF, C.A. A crucial role for CD44 in inflammation. **Trends in Molecular Medicine**. v. 7, p. 213–221, 2001.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**. v. 414(6859), p.105-111. 2001.

RICARDO, S.; VIEIRA, A. F.; GERHARD, R.; LEITÃO, D.; PINTO, R.; CAMESELLE-TEIJEIRO, J. F.; MILANEZI, F.; SCHMITT, F.; PAREDES, J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* Hove, East Sussex, Online First, 16 Jun, 2011. Disponível em: < <http://www.jcp.bmj.com/>>. Acesso em: 28 de jun. 2011.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; BISSELL, M.J. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction, **Physiological Reviews**, v. 76, p. 69-125. 1996.

RUSSO, J.; GUSTERSON, B.A.; ROGERS, A. Biology of disease. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis, **Laboratory Investigation**, v. 62, p. 244-78. 1990.

ROUSSEAU, B., CHIBAUDEL, B., BACHET, J., LARSEN, A., TOURNIGAND, C., LOUVET, C., et al. Stage II and stage III colon cancer: treatment advances and future directions. **Cancer Journal**. v. 16, p. 202-209. 2010.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; de TOLLA, L.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16 p, 542–547. 2004.

SAS Institute Inc. **The SAS System, release 9.2**. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**. v. 26, p. 419–426, 1970.

SELL, S. Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? **Environmental Health Perspective**. v. 101, p. 15-26, 1993.

SHACKLETON, M.; QUINTANA, E.; FEARON, E.R.; MORRISON, S.J. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. **Cell** v.138, p. 822–829, 2009.

SHIPITSIN, M.; POLYAK, K. The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. **Laboratory Investigation**. v. 88, p. 459–463, 2008.

SHOFER, F.S.; SONNENSCHN, E.G.; GOLDSCHMIDT, M.H.; LASTER, L.L.; GLICKMAN, L.T. Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. **Breast Cancer Resources Treatment**. v. 1, p. 49–60, 1989.

SNEATH, R.J.; MANGHAM, D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. **Molecular Pathology**. v. 51, p. 191–200, 1998.

SORENMO, K.U.;RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**. v. 48, n.1, p. 85-97. 2011.

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, p.495-502, 2005.

TAKAISHI, S.; OKUMURA, T.; TU, S.; WANG, S.S.; SHIBATA, W.; VIGNESHWARAN, R.; GORDON, S.A.; SHIMADA, Y.; WANG, T.C. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. **Stem Cells** v. 27, p. 1006–1020, 2009.

TAYLOR, G.N.; SHABESTARI, L.; WILLIAMS, J.; MAYS, C.W.; ANGUS, W.; McFARLAND, S. Mammary Neoplasia in a Closed Beagle Colony. **Cancer Research**. v. 36, p. 2740–2743, 1976.

THIERY, J.P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R.Y.; NIETO, M.A. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. **Cell** v.139, p. 871-890, 2009.

TROSKO, J.E. The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, p.43-48, 2003.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**. v. 7, n.9, p. 659-672, 2007.

VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; BRAGA, J.L. Cancer: biologia, fractais e inteligencia artificial. **Ciencia Hoje**. v. 24, n.141, p. 16-25, 1998.

VILELA,M.J.; MARTINS, M.L.; RENATO, N.S.; CAZARES, L.; LATTANZIO, F.; WARD, M.; SEMMES, O.J. Proteomic and fractal analysis of a phenotypic transition in the growth of human breast cells in culture. **Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment**. v. 12, 12006p, 2007.

VULLIAMY, T.; MARRONE, A.; GOLDMAN, F.; DEARLOVE, A.; BESSLER, M.; MASON, P.J.; DOKAL, I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenital. **Nature**. v. 413, p. 432-435, 2001.

VULLIAMY, T.; MARRONE, A.; DOKAL, I.; MASON, P.J. Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. **The Lancet**. v. 359, p. 2168-2170, 2002.

WEBSTER, J.D., YUZBASIYAN-GURKAN, V., TROSKO, J.E., CHANG, C.-C., KIUPEL, M. Expression of the Embryonic Transcription Factor Oct4 in Canine Neoplasms: a Potential Marker for Stem Cell Subpopulations in Neoplasia. **Veterinary Pathology**. v.44, p.893-900, 2007.

WOLNY, P.M.; BANERJI, S.; GOUNOU,C.; BRISSON, A.R.; DAY, A.J.; JACKSON, D.G.; RICHTER,R.P. Analysis of CD44-Hyaluronan interactions in an artificial membrane system. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 39, p. 30170-30180. 2010.

WRIGHT, W.E.; PIATYSZEK, M.A.; RAINEY, W. E.; BYRD, W.; SHAY, J.W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. **Developmental Genetics**. v. 18, p. 173-179, 1996.

WU, H.; LI, R.; HANG, X.D.; YAN, M.; NIU, F.; LIU, W.; ZHAO, S.; ZHANG, S. Can CD44+/CD24- Tumor cells be used to determine the extent of breast cancer invasion following neoadjuvant chemotherapy? **Journal of Breast Cancer**. v. 14, n. 3, p. 175-180, 2011.

WU, X.Z. Origin of Cancer Stem Cells: The Role of Self-renewal and Differentiation. **Annals of Surgical Oncology**. v.15, p.407-414, 2007.

YAZAWA, M.; OKUDA, M.; SETOGUCHI, A.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; WATARI, T.; TSUJIMOTO, H. Measurement of telomerase activity in dog tumors. **Journal of veterinary Medicine Science**. v. 61, p. 1125-1129, 1999.

ZAVLARIS, M.; ANGELOPOULOU, K.;VLEMMAS, I.; PAPAIOANNOU, N. Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression in canine mammary tissues: a specific marker for malignancy? **Anticancer Research**. v. 29, p. 319-326, 2009.

ZUCCARI, D.A.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Expression of intermediate filaments in canine mammary tumor diagnosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v. 54, p. 586-91, 2002.