UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DE MICROMETÁSTASES DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESPONTÂNEAS EM LINFONODOS DE CADELAS POR MEIO DO RECEPTOR CD44

Geórgia Modé Magalhães

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOMARCAÇÃO DE MICROMETÁSTASES DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESPONTÂNEAS EM LINFONODOS DE CADELAS POR MEIO DO RECEPTOR CD44

Geórgia Modé Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2010

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

trabalhos, com posterior publicação no Periódico Internacional Veterinary Comparative Oncology. Recebeu o título de melhor relato de caso no curso de Oncologia da UNESP de Botucatu (2008) e recentemente ganhou terceiro lugar no concurso de redação científica no prêmio Walthan da Pedigree (2008-2009), na condição de orientadora de uma graduanda do Curso de Medicina Veterinária. Foi aprovada para o mesmo Programa de Pós-Graduação, onde iniciará seu Doutorado em março de 2010. Em Janeiro de 2010 foi aprovada em um concurso para Professor Substituto na Faculdade Federal de Uberlândia na área de Patologia Veterinária.

AGRADECIMENTOS

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

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos Professores do Hospital Veterinário Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Wilter Ricardo R. Vicente e Mirela Tinucci Costa pela gentil disposição das amostras de tecidos mamários.

Às técnicas Maria Inês Yamazaki de Campos e Francisca de Assis Ardison pelo excelente trabalho nas confecções das lâminas.

À minha amiga Ana Carolina Trompieri pelos ensinamentos imuno-histoquímicos e por grandes lições que me passou durante esses dois anos.

SUMÁRIO

		Página
LISTA DE TABELAS		vii
LISTA DE FIGURAS		viii
LISTA DE ABREVIATURAS		ix
RESUMO		x
ABSTRACT		xii
I	Introdução	1
II	Revisão de literatura	3
	II-1 Neoplasias mamárias	3
	II-2 Metástase e fatores relacionados	5
III	Objetivos	11
IV	Materiais e Métodos	12
	IV-1 Grupos Experimentais	12
	IV-2 Imuno-histoquímica	15
	IV-3 Contagem das células marcadas	19
	IV-4 Análise estatística	19
V	Resultados	20
VI	Discussão	27
VII	Conclusões	35
VIII	Referências	50
	.	

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1..... 16

Tabela 2..... 18

Tabela 3..... 22

Tabela 4..... 25

Tabela 5..... 26

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1..... 28
Figura 2..... 29
Figura 3..... 30
Figura 4..... 31
Figura 5..... 32
Figura 6..... 33
Figura 7..... 34
Figura 8..... 35
Figura 9..... 36
Figura 10..... 37
Figura 11..... 38
Figura 12..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Método do Complexo Streptavidina Peroxidase
CC - Carcinoma complexo
CD44 - Molécula de adesão que pertence à família de glicoproteínas transmembranas.
CS - Carcinoma sólido
CSTP - Carcinoma simples túbulo papilífero
DAB – Diaminobenzidina
HÁ – Ácido Hialurônico
HRP - Horseradish peroxidase
MMP - Matriz Metaloproteinase da matriz
NAMI-A - imidazolium trans-imidazole dimethyl sulfoxide tetrachlororuthenate
OSH - Ovário Histerectomia
PBS - Phosphate-buffered saline
SAS - Statistical Analysis System
SRD - Sem raça definida
TIMP - Inibidores de Metaloproteinase da matriz
VEGF - Vascular endotelium growth factor
VLA-4 - Very Late Antigen-4
VLA-5 - Very Late Antigen-5
WHO - World Health Organization

RESUMO

IMUNOMARCAÇÃO DE MICROMETÁSTASES DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS ESPONTÂNEAS EM LINFONODOS DE CADELAS POR MEIO DO RECEPTOR CD44

As neoplasias mamárias caninas são as mais frequentes nessa espécie e também são comuns em mulheres. Um dos principais fatores prognósticos dessa enfermidade é a presença ou ausência de metástase em linfonodos. A metástase é um mecanismo complexo que envolve vários fatores. Em mulheres sabe-se que a molécula de adesão CD44 está relacionada com invasão e metástase. Este trabalho teve como objetivos: avaliar a imunomarcação de CD44 nas neoplasias mamárias malignas da cadela, com e sem metástase em linfonodos regionais; associá-la como fator prognóstico; na detecção precoce de metástase; relacioná-la com a imunomarcação de MMP-9, E-caderina e VEGF e associar com a sobrevida das cadelas. Compuseram os grupos experimentais, cadelas com tumor mamário, com (Grupo M) ou sem metástase (Grupo N) detectável em linfonodos e um grupo controle composto por tecido mamário normal. Não houve predileção por localização mamária, mas utilizou-se mais as mamas inguinais e linfonodos inguinais. As neoplasias mamárias foram classificadas de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Para isso utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica, em amostras incluídas em parafina. Para a determinação da porcentagem de imunomarcação considerou-se somente as células epiteliais neoplásicas. Para o anticorpo CD44 contou-se as marcações em linfócitos T nos linfonodos dos dois grupos Observou-se aumento significativo na marcação do CD44 do sítio primário do tumor para a metástase, assim como nas marcações de MMP-9 e E-caderina. As marcações em linfócitos T foram maiores no grupo N e

menores no grupo M. O tipo histopatológico mais comum foi o carcinoma simples túbulo papilífero. A raça predominante no grupo das metástases foi Teckel, com idade média de 9,4 anos, e com tempo de sobrevida de sete meses. Concluiu-se que o CD44 pode atuar em conjunto com outras moléculas, tais como a MMP-9 e a E-caderina. Propõe-se que a detecção precoce de micrometástase seja feita em linfócitos T nos linfonodos drenantes das neoplasias mamárias malignas de cadelas.

Palavras chave: tumor mamário canino, CD44, metástase, neoplasia, oncologia, cães.

ABSTRACT

IMMUNOSTAINING OF MICROMETASTASES OF SPONTANEOUS MAMMARY NEOPLASIAS OF BITCHES IN LYMPH NODES THROUGH RECEPTOR CD44

Mammary neoplasia are the most frequently type of cancer in bitches and also in women. One of the main prognostic factors of this desease is the presence or absent of lymphonodes metastasis. Metastasis is a complex mechanism which involve multiple factors. At women, researchs have shown that the CD44, a adhesion molecule, is related with invasion and metastasis. This research looked for as objectives: Evaluation of CD44 in malignant mammary neoplasia at bitches with and without lymphonodes metastasis; link CD44 and prognosis; CD44 and early detection of metastasis; link CD44 with MMP-9; E-cadherin and VEGF; and associate with the survival of bitches. Experimental groups were arranged with bitches suffering from mammary neoplasia and divided into three groups: Group one(M) were compounded by bitches with visible metastasis in the lymphonodes; Group two(N) were compounded by bitches without visible metastasis in the lymphonodes;Group three or control compounded by bitches with normal mammary tissue. During the research did not have predilection about the mammary localization, despite inguinal breast and lymphonodes were more collected. Mammary neoplasias were classified according to the OMS norms. For this we used the technique of immunohistochemistry in paraffin sections and counted only epithelial cancer cells by method of percentage of labeled cells. Only antibody to CD44 told that the markings on T lymphocytes in lymph nodes of the two groups observed a significant increase in CD44 marking the site of the primary tumor to metastasis, as well as the markings of MMP-9 and E-cadherin. The markings on T lymphocytes were higher in group N and lower in group M. The most common pathological type was the simple tubular papillary carcinoma. The

predominant race in the group of metastasis was Daschshund, mean age 9,4 years, and survival time, counting the time of mastectomy until November 2009, were 7 months. It was concluded that CD44 may be involved in the performance of other molecules such as MMP-9 and E-cadherin. It is proposed that the early detection of micrometastasis is made in T lymphocytes in draining lymph nodes of malignant mammary neoplasias in bitches.

Keywords: canine mammary tumors, CD44, metastases, cancer, oncology, dogs.

I. INTRODUÇÃO

Os cães prestam-se como modelos apropriados ao estudo de neoplasias, especialmente as mamárias. Isso se deve à alta incidência de neoplasia mamária em cadelas e também à semelhança do comportamento biológico e dos tipos histopatológicos desses tumores, quando comparados com a espécie humana. Além disso, relações como idade desencadeante e influência hormonal estão presentes nos tumores mamários.

A invasão e a metástase são características biológicas importantes dos tumores malignos de mama e influenciam diretamente no prognóstico. A disseminação das neoplasias pela corrente linfática ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que é a via mais comum. Talvez o linfonodo seja o primeiro local a apresentar a implantação de células malignas. Sendo assim, a detecção das micrometástases em linfonodos drenantes do tumor torna-se uma ferramenta importante na condução do tratamento desta doença.

Os marcadores celulares envolvidos no processo de metástase - CD44, VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), Metaloproteinases (MMPs) e E-caderina, foram analisados, por meio de imuno-histoquímica, em amostras de neoplasias mamárias caninas e em linfonodos regionais. Neste estudo, procurou-se relacionar a presença de metástase com o comportamento desses tumores nas cadelas, com o objetivo de fornecer elementos que levem à melhor compreensão

do fenômeno e com isso seja possível aperfeiçoar o prognóstico e o tratamento deste tipo de tumor. Ao mesmo tempo, estes resultados podem ser comparados com os descritos em tumores mamários da mulher, quando se considera o cão como modelo animal. Mais importante ainda seria a contribuição desses resultados para a oncologia veterinária, já que existem poucos estudos com marcadores de prognóstico em tumores mamários na cadela.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II. 1- Neoplasias Mamárias

Tumores mamários em cadelas são os mais freqüentes da espécie canina (MOULTON, 1990; DAGLI, 2008) e são úteis como modelo experimental para a espécie humana (SCHENEIDER *et al.*, 1970; MOTTOLESE *et al.*, 1994; SCHAFER *et al.*, 1998; GAMA *et al.*, 2008; UVA, *et al.*, 2009). Os carcinomas mamários em cadelas apresentam comportamento biológico e apresentação histopatológica muito semelhantes aos tumores humanos, tanto que se prestam a testes de agentes terapêuticos (MAcEWEN, 1990; PELETEIRO, 1994; KUSEWITT & RUSH, 2007; GAMA *et al.*, 2008).

Reforçando este aspecto, relata-se que tumores mamários de mulheres e de cadelas são semelhantes quanto à dependência da idade, sendo a mínima de 25 anos para as mulheres e cinco anos para a cadela. Em média, os tumores têm maior incidência após a menopausa para as mulheres e entre os 10 e 11 anos para as cadelas (COHEN *et al.* 1974; KUMAR *et al.*, 2005). A exposição a estrógenos está associada ao desenvolvimento e progressão dos tumores de mama humanos e caninos (KUMARAGURUPARAN *et al.*, 2006). A fase de desenvolvimento do ciclo estral provavelmente tem muita influência nas neoplasias mamárias em caninas (MOULTON, 1990). Sabe-se que cadelas castradas antes do primeiro cio possuem 0,5% de incidência de tumores

mamários, enquanto a incidência é de 8 ou 26% se a cirurgia for realizada após o primeiro ou o segundo estro, respectivamente (SCHNCIDER *et al.*, 1969).

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

Em ambas as espécies, a maioria dos tumores malignos cresce a partir do tecido epitelial da mama, gerando, com muita frequência, metástases nos pulmões e em outros órgãos (OWEN, 1979; SORENMO, 2003). Os tumores de mama representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias na fêmea canina, sendo que 50% delas são malignas (KENNEDY & MILLER 1993; RUTTEMAN *et*

al., 2001). O tipo histológico predominante em mulheres é o adenocarcinoma (KELSEY, *et al.* 1998), sendo o carcinoma invasivo ductal correspondente a 75 a 80% de todas as neoplasias mamárias invasivas (ANKIT BHARAT *et al.*, 2009). Os tumores mesenquimais são raros em mulheres (BOUSQUET *et al.*, 2007).

Karayannopoulou *et al.* (2005) observaram uma correlação dos tipos histológicos com o grau de malignidade de tumores de mama no cão. Os carcinomas complexos foram relacionados com o grau I, enquanto os carcinomas simples (os tipos mais malignos) foram relacionados com os graus II e III. Mais importante que o tipo histológico seria verificar se o tumor se apresenta invasivo ou não (MOULTON,1990). A análise do linfonodo drenante do tumor é considerada uma ferramenta extremamente útil para a detecção de metástases, e contribui para a definição de um prognóstico favorável ou desfavorável (KARAYANNOPOULOU *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por FOWLER *et al.* (1974), a média de sobrevida de cadelas após o diagnóstico de carcinoma papilífero infiltrativo foi de 5,6 meses, do carcinoma lobular infiltrativo foi de 7,3 meses e o do carcinoma esquirroso foi de 9,7 meses. Já os carcinomas que cresceram do alvéolo intralobular ou do epitélio ductuolar e foram classificados como não infiltrativos tiveram uma sobrevida de 36 meses (MOULTON, 1990).

II.2- Metástase e fatores relacionados

A invasão e a metástase são características biológicas dos tumores malignos e influenciam diretamente no prognóstico do câncer de mama. Para que

as células tumorais se desprendam de uma massa primária, penetrem nos vasos sangüíneos ou linfáticos e produzam um segundo crescimento tumoral num local à distância, elas devem superar uma série de barreiras e podem estar sujeitas a diversas influências. A capacidade das células neoplásicas de se desprenderem da massa tumoral primária é a principal característica favorável para o início do processo metastático (KUMAR *et al.*, 2005).

A presença ou ausência de metástases em linfonodos é o mais importante fator prognóstico em tumores de mama em mulheres (SOARES *et al.*, 2007). Algumas vezes, pode ser de difícil visibilização a presença de células metastáticas em linfonodos. Em um estudo em cadelas com tumores de mamas, Matos *et al*. (2006) detectaram, por meio de imunomarcações com citoqueratina, micrometástases em 9,2% dos linfonodos que haviam sido negativos no exame histopatológico de rotina.

A destruição da membrana basal é um dos passos mais importantes para a metástase tumoral. As metaloproteinases da matriz (MMP) são proteases zinco-dependente, capazes de degradar a membrana basal, assim como a matriz extracelular. Segundo Shah *et al*. (2009), há relação clínica significativa desta enzima proteolítica com o crescimento, a invasão e a metástase em câncer de mama. Kawai *et al*. (2006) observaram que a atividade latente das MMPs foi maior em tumores mamários malignos, em ratos, do que em tecidos normais. As MMPs 2, 7 e 9 foram observadas mais em tumores malignos primários do que em metástase (FU *et al.*, 2009).

Normalmente existem diversas moléculas de adesão entre as células, nas quais a família caderina, de glicoproteínas transmembrana, tem importância particular. Sua principal função é manter a arquitetura normal do tecido, particularmente mediando às adesões homotípicas (MATOS *et al.*, 2007). As E-caderinas estão ligadas ao citoesqueleto por meio das cateninas, proteínas que ficam sob a membrana plasmática. Matos *et al*. (2007) mostraram que somente as E-caderinas, como fator separado das cateninas, estavam significativamente associadas com a invasão tumoral e com a metástase em linfonodos. As células tumorais que apresentam expressão de E-caderina preservada tendem a crescer expansivamente, enquanto aquelas que expressam pouca E-caderina tendem a crescer infiltrativamente, no câncer de mama da mulher (OKA *et al.*, 1993). Em cães, as relações significativas entre E-caderina e outros fatores relacionados a um pobre prognóstico sugerem que a perda da expressão de E-caderina pode ter um valor prognóstico em tumores mamários malignos caninos (MATOS *et al.*, 2006).

Em tecidos normais a formação de novos vasos é regulada por fatores estimulatórios e inibitórios, os quais funcionam com um delicado equilíbrio. Qualquer mudança na homeostase do tecido, seja fisiológica ou patológica, pode perturbar esse equilíbrio e resultar a formação de um fenótipo angiogênico. Não se sabe se o tumor quebra esse equilíbrio e estimula a angiogênese ou se ele adquire características de malignidade a partir de um fenótipo angiogênico já existente (RESTUCCI *et al.*, 2000).

A angiogênese está relacionada com o processo de metástase. Em estudos com o VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), quando este é superexpresso, ocorre a invasão e metástase em carcinomas mamários caninos (RESTUCCI *et al.*, 2002), da mesma forma, a sua detecção no soro e plasma dos cães foi maior nos tumores metastáticos do que em tumores não metastáticos em cães (KATO, *et al.*, 2006)

O CD44 é uma molécula de adesão, multifuncional e multiestrutural, pertencente à família de glicoproteínas transmembrana e está intimamente relacionada com a progressão tumoral (KLINGBEIL *et al.*, 2009). Está envolvida nas interações célula a célula e entre a célula e a matriz (NAOR *et al.*, 1997). O enfraquecimento do mecanismo de adesão celular é o pré-requisito básico para a ocorrência de metástase (POZDNYAKOVA *et al.*, 2009), porém pouco se sabe sobre o mecanismo pelo o qual a molécula CD44 interfere nas metástases.

CD44 é codificada por um gene de 20 exons, sendo que os cinco primeiros e os cinco últimos são constantes e, 10 deles estão sujeitos a regiões variáveis com *splicing* alternativos de RNA nuclear (NAOR *et al.*,1997). Essa região de variabilidade da molécula confere várias isoformas de papéis diversos em suas estruturas e funções (GOTTE & YIP 2006). Numerosas combinações dos exons variantes foram detectadas em mais de 30 diferentes isoformas relatadas em vários tipos de tecidos, na embriogêneses, na linfo-hematopoese e na ativação leucocitária.

A matriz extracelular é formada por cadeias de polissacarídeos da classe denominada glicosaminoglicana, sendo um deles o ácido hialurônico (HA). Muitas

funções do HA dependem de proteínas ligadoras, algumas das quais são componentes da matriz extracelular e outras da superfície de células. A função do HA é manter a hidratação e integridade estrutural do tecido (HAMILTON *et al.*, 2007). O CD44 é o principal receptor de superfície celular para o HA (SHERIDAN *et al.*, 2006; HAMILTON *et al.*, 2007). Em um estudo com carcinomas mamários invasivos, concluiu-se que as linhagens celulares deste tumor produziam HA endógeno, possivelmente aumentando a rapidez da motilidade dessas células (HAMILTON *et al.*, 2007).

Yin & Qin (2003) demonstraram em estudos experimentais que altos níveis de E-caderina podem inibir a ligação do CD44 com o HA, diminuindo assim a motilidade celular. O CD44 também sinaliza a célula a se ligar com receptores da MMP (HAMILTON *et al.*, 2007). Kuo *et al*., (2009) trataram linhagens celulares de tumores mamários (MDA-MB-435s) com TGF-beta e obtiveram um aumento da sinalização para as MMP nas membranas celulares. Com o aumento das MMPs também se observou um aumento do CD44 e assim houve uma maior invasividade de células cancerígenas. PACOR *et al.* (2004) realizaram tratamentos intratumorais com NAMI-A, um metal com propriedades eficientes contra metástases pulmonares de tumores sólidos em ratos. Esta droga reduziu a expressão de CD44, a qual diminuiu a modulação de MMP-9 interferindo nas propriedades malignas das células tumorais em degradar a matriz extracelular, invasão e disseminação metastática.

A ligação entre o CD44 e o ácido HA está envolvida com a morfogênese, a inflamação e a invasão tumoral. Abbas *et al*. (2000) relataram que o papel da

molécula de adesão CD44 na resposta inflamatória está relacionado com a migração e a indução de memória em células T. Os linfócitos T, os quais especificamente reconhecem antígenos, recebem sinais desses receptores antigênicos, com aumento da afinidade das integrinas por seus ligantes. Duas dessas integrinas, VLA-4 e VLA-5, ligam-se à fibronectina na matriz extracelular e a terceira, que é a molécula de adesão (CD44), liga-se ao àcido hialurônico. O CD44 tem sido envolvido na produção de citocinas, tais como a interleucina 8 e o fator de crescimento de fibroblastos.

Estes fatos indicam que o CD44 possui um papel importante na emissão de sinais oncogênicos em neoplasias mamárias (BOURGUIGNON *et al.*, 2003). O receptor CD44 é expresso em tecidos normais e há muitas variantes deste receptor, sendo a CD44v6 superexpressa em tumores de mama da mulher (DIAZ *et al.*, 2005). Combinações contendo exon 6v parecem ter uma grande importância em disseminações de carcinomas pancreáticos em ratos, em linfoma não Hodgkin humano e carcinoma de cólon, também em carcinoma mamário (FRIEDRICHS,*et al.*, 1995, HEBBARD, *et al.*,2000).

A detecção precoce de metástase está diretamente ligada ao fator prognóstico. Harrell *et al*. (2006) mostram que o CD44 é expresso em tumores primários e superexpresso em êmbolos tumorais linfáticos e metástases, concluindo que as subpopulações de CD44 no sítio primário são preferencialmente atraídas para os vasos linfáticos tumorais e seus linfonodos. Nesse contexto, o estudo do comportamento das micrometástases, em linfonodos drenantes do tumor mamário por meio do CD44, pode ser uma ferramenta útil no

prognóstico e no direcionamento do tratamento. A compreensão dos mecanismos moleculares da formação de metástases fornecerá dados para o aperfeiçoamento no tratamento do tumor.

Até o presente momento apenas um trabalho relacionado ao CD44 em cães foi encontrado (MADRAZO, *et al.*, 2009). Sendo necessárias mais pesquisas a respeito deste imunomarcador favorecendo tanto a oncologia veterinária quanto a comparação das neoplasias mamárias em cadelas com a espécie humana.

III. **OBJETIVOS**

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a imunomarcação de receptor CD44 em linfonodos drenantes de tumores mamários caninos, relacionando-o com o tempo de sobrevida;
- Quantificar a marcação do CD44 em linfócitos T nos linfonodos de cadelas com neoplasia mamária e cadelas com neoplasias mamárias com metástase em linfonodo.
- Estabelecer uma relação entre o grau histológico das neoplasias mamárias e as metástases em linfonodos;
- Relacionar estes achados com moléculas envolvidas no processo de mestástase como VEGF, E-caderina e colagenases.

IV- MATERIAL E MÉTODOS

IV.1- Grupos experimentais:

Compuseram os grupos experimentais cadelas com tumor mamário, com ou sem metástase visível em linfonodos, e um grupo controle composto por tecido mamário normal. Não houve predileção por localização mamária, mas utilizou-se mais as mamas inguinais e linfonodos inguinais.

Grupo N (n=10) - Neoplasia mamária e linfonodo sem metástase visível em microscopia de luz;

Grupo M (n=10) - Neoplasia mamária e linfonodos com metástases observadas microscopicamente.

Grupo C (n=4) – Tecido mamário normal e linfonodos sem alterações neoplásicas. Utilizado como controle das imuno-histoquímicas.

O grupo controle foi composto por fragmentos de tecido mamário e de linfonodos de cadelas sem histórico de neoplasia mamária, provenientes do serviço de necropsia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal.

Os fragmentos de áreas significativas dos tumores mamários e de linfonodos drenantes foram adquiridos do Serviço de Reprodução e Obstetrícia Veterinária, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV - UNESP, Jaboticabal, SP e de clinicas particulares. Foram considerados como critérios de avaliação as dimensões do tumor, a sua relação com o tecido adjacente (presença

de cápsula, séssil ou pediculado), a presença de úlceras, de hemorragia, de secreções ou de exsudato inflamatório.

O aspecto macroscópico de cada neoplasia foi avaliado e os fragmentos colhidos fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos, pH 7,4 e processados rotineiramente até a inclusão em parafina. Cortes de 5µ foram feitos em micrótomo e posteriormente corados pelo método da Hematoxilina e Eosina. O processamento histológico foi feito no Departamento de Patologia Veterinária (FCAV-UNESP), Câmpus de Jaboticabal – SP.

Na análise microscópica em microscopia de luz, foi feita a classificação da neoplasia, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (MISDORP *et al.* 1999), avaliou-se o grau de diferenciação celular, o pleomorfismo, a anaplasia, a presença de figuras de mitose, de êmbolos em vasos sangüíneos e em linfáticos, a invasão do tecido adjacente e de metástases em linfonodos. Após a classificação, apenas os carcinomas foram utilizados neste experimento para uma melhor comparação entre a espécie canina e humana, já que os tumores mesenquimais e mistos são raros na espécie humana.

O grau de malignidade em cadelas foi proposto por Misdorp (1999), associando as formações de túbulos, hipercromatismo, mitoses e pleomorfismo nuclear, de acordo com o Quadro 1:

Quadro 1 – Características utilizadas para classificação dos tumores mamários das cadelas conforme o grau de malignidade.

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

Fonte: Misdorp *et al.*, 1999

Nos grupos N e M adquiriram-se informações em relação à idade, raça e realização de quimioterapia. Além disso, essas cadelas foram acompanhadas para obter-se o tempo de sobrevida, que foi considerado a partir da mastectomia até novembro de 2009.

IV.2- Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica foram utilizados cortes de mama e linfonodo regional incluídos em parafina, para todos os anticorpos, (anti-CD44, antimetaloproteinase, anti-VGEF e anti-E-caderina) de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Anticorpos utilizados em tecidos de neoplasmas mamários, tecidos mamários normais, linfonodos com metástases e linfonodos normais de cadelas.

Anticorpos anti	**Clones**	**Diluições**	**Procedência**
CD44v6 (M)*	DF1485	1:50	DAKO, ref. M7082
VEGF (M)	VG-1	1:300	Abcam, ref. ab1316-100
E-caderina (M)	4A2C7	1:100	Zymed Lab., ref. 33-4000
Metaloproteinasease (MMP) (P)	_____	1:200	DAKO, ref A0150

*M=monoclonal e P=policlonal

A técnica imuno-histoquímica empregada foi o complexo estreptavidina peroxidase (ABC), desenvolvido por HSU *et al.* (1981), com ligeiras modificações. Resumidamente, os cortes foram desparafinizados, reidratados e, então, incubados por vinte minutos em uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio, em metanol absoluto, para bloqueio da peroxidase endógena. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor (Tabela 2). Após essa etapa, os cortes foram lavados por três vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M (pH 7,2), por 5 min e, a seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (*protein block*

serum-free – DAKO ref. X0909). Ato contínuo, os cortes foram incubados em câmara úmida com os anticorpos primários na diluição ótima (Tab. 1), e então incubados a 4°C por 18 horas. Apenas o anticorpo MMP-9 foi incubado a 28°C por uma hora. Depois os cortes foram novamente lavados em PBS, e incubados com o anticorpo secundário biotinilado (*kit* DAKO LSAB, ref. K0690) à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, nova lavagem foi realizada com PBS para remoção do excesso de anticorpo, procedendo-se então a incubação com o complexo streptoavidina-biotina, por 30 minutos (*Kit* DAKO LSAB,ref.. K0690), à temperatura ambiente, para detecção do produto da reação. Para o anticorpo VEGF usou-se o método polímero, (*kit* ENVISION + *Dual Link System Peroxidase* ref K4061 - DAKO) por uma hora substituindo o anticorpo secundário e o complexo streptoavidina-biotina. As lâminas foram novamente lavadas, e a reação revelada pelo substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB - DAKO ref. K3466).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem em água destilada, seguidas de contracoloração com Hematoxilina de Harris (1-2 minutos). Os cortes passaram pela bateria crescente de álcool e por xilol, foram montados com bálsamo do Canadá e observados em microscópio de luz.

Tabela 2 - Tipo de recuperação antigênica, tempo e diluição utilizada para cada anticorpo primário, dos cortes de tecido mamário e linfóide de cadelas com tumor de mama.

ANTICORPO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNCIA	TEMPO	Incubação do anticorpo primário
E-caderina*	Banho-Maria 97ºC	40 minutos	4°C por 18 h
VEGF*	Banho-Maria 97ºC	40 minutos	4°C por 18 h
MMP-9**	Steamer	20 minutos	28°C por 1 h
CD44**	Micro-ondas	2 + 10 minutos♣	4°C por 18 h

* *Target Retrieval Solution 10x concentrate* - catálogo nº S1699-DAKO Corp.
** Tampão Citrato pH 6,0
♣ Potência máxima: 2min; potência mínima: 10 minutos, com reposição de tampão depois de 5 min.

A definição de controle positivo, segundo Ramos-Vara *et al*. (2008) é a utilização de um tecido controle em que o antígeno de interesse detectado já seja conhecido pelo mesmo método imuno-histoquímico. Sendo assim, para o anticorpo E-caderina e MMP-9 foi usado como controle positivo o próprio epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da pele. Para o anticorpo CD44, as glândulas mamárias normais adjacentes às células neoplásicas foram usadas como controle positivo interno. E para o VEGF utilizou-se as próprias células endoteliais dos vasos sanguineos dos tumores (controle interno).

Como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por PBS em todas as reações imuno-histoquímicas.

IV-3- **Contagem das células marcadas**

A observação das células foi feita em microscópio de luz binocular com equipamento para fotomicrografia digital (Nikon E200). Antes da contagem, foram feitas observações quanto ao tipo de células marcadas e a distribuição da marcação. Para a quantificação da freqüência da imunomarcação, foram aleatoriamente selecionados quatro campos por corte e foi contado um total de 100 células entre as marcadas e as não marcadas, utilizando-se objetiva de 40x. Os resultados foram expressos em porcentagem de células marcadas.

As contagens no grupo C foram realizadas em células epiteliais mamárias normais. No grupo N as contagens foram realizadas apenas em células neoplásicas mamárias. Já no grupo M, as contagens foram realizadas tanto nas células neoplásicas do sítio primário do tumor quanto nas células neoplásicas metastáticas em linfonodos ou em vasos linfáticos. E apenas para o anticorpo anti-CD44 contou-se os linfócitos T tanto nos linfonodos do grupo N quanto os do grupo M.

IV.4 - Análise estatística:

Análises pelo método dos quadrados mínimos foram realizadas para avaliar o efeito de grupo de metástase e classes de idade sobre os anticorpos E-caderina,

Metaloproteinase, VEGF e CD44. Foram verificadas as pressuposições básicas para a realização da análise de variância. Assim, a variável CD44 foi submetida à transformação logarítmica. Médias por classe de idade foram comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Foi aplicado o teste T para comparação de resultados entre os grupos N (nas células epiteliais mamárias neoplásicas) e M (células epiteliais neoplásicas mamárias metastáticas) para cada anticorpo: CD44, E-caderina, MMP e VEGF. Também, compararam-se por esse mesmo teste no grupo M as células marcadas no sítio primário do tumor e suas respectivas metástases em todos os anticorpos citados acima. E somente para o anticorpo anti-CD44 analisou-se por esse mesmo teste os linfócitos T marcados nos grupos N e M.

A associação entre metástase e tipo histológico, grau de malignidade e tempo de sobrevida foi verificada pelo Teste Exato de Fisher.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

V- RESULTADOS

Na avaliação macroscópica dos tumores, de um total de 20 amostras, quatro apresentavam aspecto cístico, dois continham hemorragia e três apresentavam áreas de necrose. Algumas informações não puderam ser obtidas devido a doações de amostras principalmente provenientes de clínicas particulares.

Os tumores foram classificados por um observador de acordo com a classificação da WHO (MISDORP *et al.* 1999). Os tipos histológicos encontrados no grupo N foram cinco tumores classificados em carcinoma complexo, sendo composto por células epiteliais e componentes mioepiteliais. Três tumores foram classificados como carcinoma simples padrão túbulo papilífero, apresentando um tipo de célula (epitelial) e caracterizado pela formação de túbulos e papilas. E o restante (dois tumores) classificados como carcinoma simples padrão sólido, também com um único tipo de célula (epitelial) e apresentando um padrão de distribuição sólido.

Os graus de malignidade do grupo N foram escolhidos entre os três graus para se obter uma amostra representativa de todos os graus de malignidade dos tumores. No grupo M, seis tumores foram classificados em carcinoma simples padrão túbulo papilifero e quatro em carcinoma simples padrão sólido. O grau de malignidade predominante foi o II, seguido por grau III. Neste caso não houve escolha dos graus.

Neste estudo, a raça predominante no grupo N foi a dos animais sem raça definida (SRD), seguidos por poodle e pastor alemão. Já no grupo M a raça predominante foi Teckel seguida por SRD. A idade média das cadelas do grupo M foi de 9,4 anos e no grupo N, de 10,9 anos.

No grupo N apenas um animal realizou sessões de quimioterapia e no grupo M quatro animais foram tratados com quimioterápicos. As drogas utilizadas e as quantidades de sessões estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Relação dos animais que foram submetidos à quimioterapia e seus respectivos quimioterápicos.

Animal	Grupo	Quantidade de sessões	Quimioterápico	Tempo de sobrevida
3	N	2	Carboplatina e doxorrubicina	Não informado
12	M	4	Carboplatina	4
13	M	3	Carboplatina	Mais de 19
17	M	1	Carboplatina	12
18	M	5	Carboplatina, doxorrubicina, lomustina e vinorelbina	14

A média de tempo de sobrevida das cadelas do grupo N (Tabela 5) foi de 16,4 meses. Dos dois óbitos que houve no grupo N, apenas um foi uma provável evolução do tumor causando metástase; o outro óbito foi por complicações pós-cirúrgicas e má condição corporal do animal. Já no grupo M, dos seis óbitos, quatro foram por complicações da metástase. A média de sobrevida nesse grupo foi de 7,6 meses. Destes, três tiveram metástase pulmonar. Uma informação

relevante é que, dos 10 animais do grupo M, duas cadelas exibiam parentesco de primeiro grau (mãe, animal 12 e filha, animal 18). No grupo N duas cadelas (animal 9 e 10) pertenciam à mesma proprietária, sendo expostas aos mesmos fatores ambientais.

Na análise imuno-histoquímica, os percentuais de células imunomarcadas nos tumores analisados estão descritos na tabela 4.

Para o anticorpo E-caderina, a marcação foi observada em citoplasma e membrana plasmática. Houve aumento significativo ($p<0,05$) da marcação do grupo N (Figura 1) em relação ao grupo M (Figura 2/Tabela 4). Quando se comparou o sítio primário do tumor no grupo M com a sua respectiva metástase também houve um aumento significativo nas contagens das células marcadas (Tabela 4). Nas glândulas mamárias normais, grupo C, as marcações foram observadas em 100% das células contadas (Figura 3).

Na avaliação do anticorpo anti-MMP-9, a marcação foi citoplasmática (Figura 4). Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) em relação aos grupos M e N (Figura 5). Entretanto, quando se analisou o sítio primário do tumor para sua respectiva metástase houve um aumento significativo (Tabela 4). Nas glândulas mamárias normais, grupo C, a média de células marcadas foi de 72,5%.

As marcações para o anticorpo anti-VEGF foram citoplasmáticas. Não houve diferenças significativas em relação aos grupos M e N (Figura 6). Também não se observou diferenças significativas entre o sítio primário (Figura7) e a metástase. A média de células marcadas do grupo C foi de 90%.

Para o anticorpo anti-CD44 as marcações foram consideradas positivas quando a membrana plasmática e/ou o citoplasma apresentavam-se marcados. Todas as células epiteliais glandulares mamárias normais foram imunomarcadas para o CD44, 100% marcadas (Grupo C). Houve um aumento significativo em relação ao grupo N (Figura 8) para o grupo M ($p<0,05$). E também aumento significativo das contagens de células do sítio primário em relação à respectiva metástase. No sítio primário do tumor, observou-se poucas marcações em relação ao local da metástase. Em carcinomas simples túbulo-papilíferos observou-se marcações mais intensas nos túbulos mais próximos dos normais e nas camadas mais externas de células nas papilas (Figura 9). Dois dos quatro carcinomas sólidos apresentaram pouca marcação no sítio primário. As células neoplásicas em vasos linfáticos, em sua maioria, estavam agrupadas e mesmo as que se encontravam isoladas estavam marcadas para o anticorpo CD44 (Figura 10). Nos linfonodos as células marcadas estavam agrupadas em sua maioria nos seios subcapsulares e, em apenas dois casos elas invadiram o linfonodo pelos cordões linfáticos atingindo a região medular (Figura 11).

Apenas para o anticorpo CD44 foram realizadas contagens nos linfonodos dos dois grupos, observando a marcação em linfócitos T (Figura 12). A média de células marcadas no grupo N foi de 24,4 ±11,9 e a média para o grupo M foi de 8,9± 8,9, sendo significativa essa diferença ($p< 0,05$).

Tabela 4 – Médias percentuais e desvio-padrão das contagens das células imunomarcadas pelos respectivos anticorpos nos dois grupos analisados.

ANTICORPOS	N	M	Sítio Primário da metástase
E-caderina	*61,20 ± 22,10	*90,00 ± 17,95	*61,5 ± 19,55
MMP-9	61,70 ± 17,53	*77,50 ± 16,73	*60,9 ± 13,34
VEGF	78,50 ± 16,05	83,20 ± 15,51	79,30 ± 13,22
CD44	*41,30 ± 14,82	*73,70 ± 13,50	*43,2 ±17,5

Tabela 5 – Resultado do tipo histológico, grau de malignidade, idade, raça, realização de ovariosalpingo-histerectomia e tempo de sobrevida encontrado nos tumores mamários caninos dos grupos N (neoplasia mamária) e M (neoplasia mamária e metástase em linfonodo).

Animais	Tipo Histológico	Grau de Malignidade	Idade (anos)	Raça	Tempo de sobrevida (meses)	Realização de OSH*[3]
1*	CS*[2]	II	8	Pastor Alemão	Mais de 36	Não
2	CC	II	9	Teckel	Mais de 24	Não
3	CS	III	9	SRD	Não informado	Não
4	CC	II	11	Cocker Spaniel	Mais de 19	Não
5	CSTP	III	6	SRD	18	Não
6	CSTP	III	8	Pastor Alemão	1	Não
7	CC	II	15	SRD	Mais de 12	Não
8	CC	I	6	Boxer	Mais de 14	Sim
9	CSTP	I	8	Poodle	Mais de 12	Não
10	CC	I	10	Poodle	Mais de 12	Não
11	CSTP	II	11	SRD	0*[4]	Não
12	CS	II	11	Teckel	4	Não
13	CS	III	6	Beagle	Mais de 19	Não
14	CSTP	II	12	SRD	Mais de 19	Não
15	CSTP	II	13	Teckel	Não informado	Não
16	CSTP	II	13	SRD	0	Não
17	CS	II	13	Poodle	12	Não
18	CSTP	II	9	Teckel	14	Não
19	CSTP	II	9	Boxer	1	Não
20	CS	III	12	Teckel	0	Não

* Os números de 1 a 10 representam o grupo N, enquanto que os números de 11 a 20 representam o grupo M.

*[2]CS - carcinoma simples padrão sólido, CC - carcinoma complexo, CSTP - carcinoma simples padrão túbulo-papilífero.

***[3]**OSH – ovariosalpingo-histerectomia

***[4]**Tempo 0 significa que a cadela veio a óbito durante a cirurgia.

Em análise de variância, as variáveis E-caderina, MMP, VEGF e CD44 foram comparadas nos grupos M e N e com as idades dos animais. Os resultados foram significativos quando $P<0,05$. As variáveis E-caderina e MMP-9 foram significativas em relação à metástase. A variável VEGF não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Em relação ao CD44, este foi significativo tanto em relação ao grupo da metástase quanto em relação às idades dos animais. As idades significativas para o CD44 metastático foram 6, 8, 9, e 12 anos.

O tipo histológico, grau de malignidade e tempo de sobrevida não foram significativos para a metástase entre os grupos avaliados.

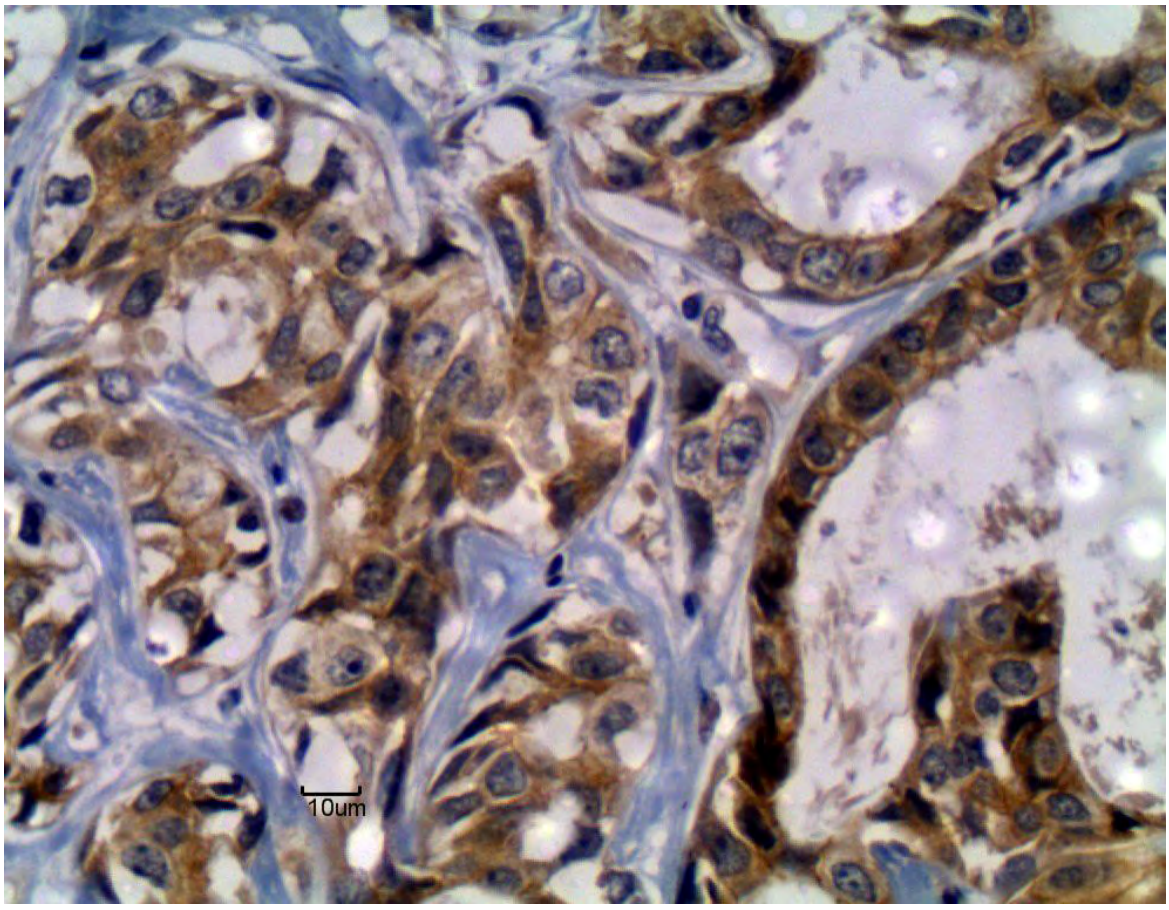

Figura 1: Neoplasia mamária de cadela sem metástase em linfonodo (Grupo N), Marcação imuno-histoquímica para E-caderina, observada na membrana plasmática e no citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

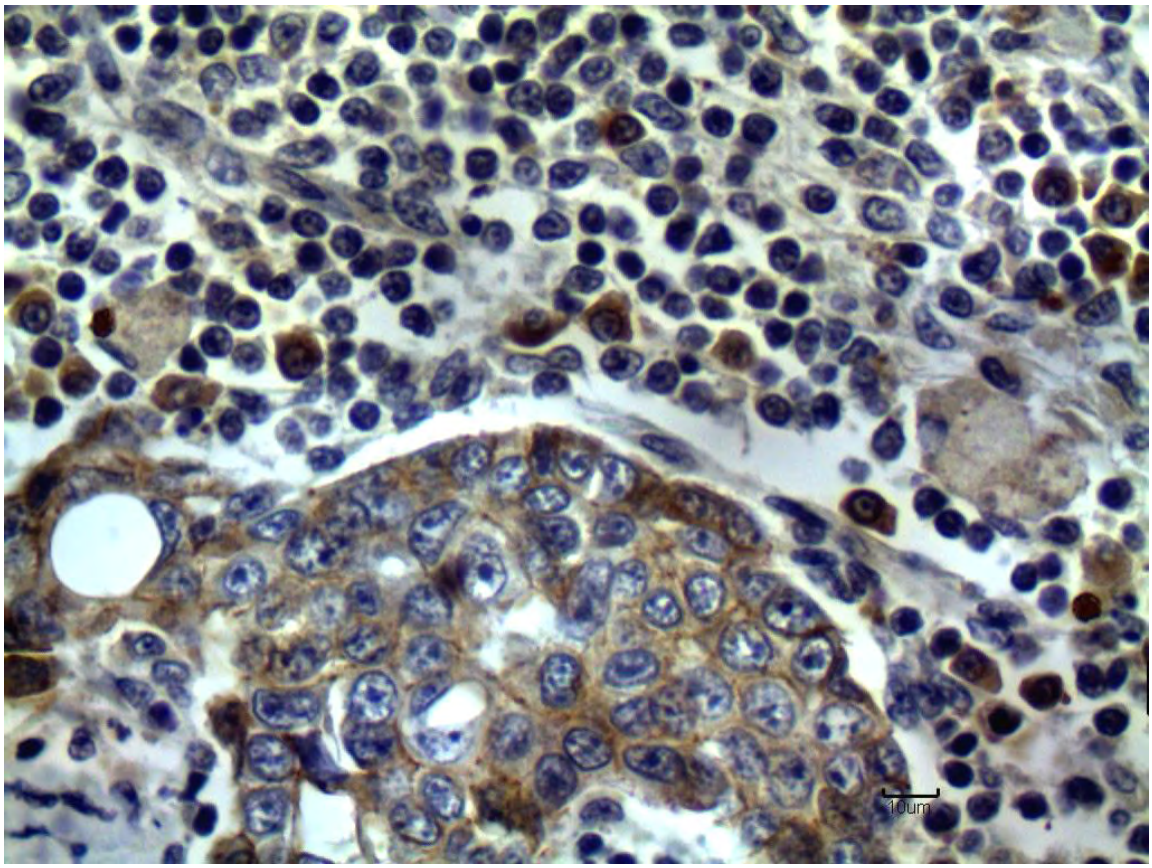

Figura 2: Neoplasia mamária metastática de cadela em linfonodo regional (Grupo M). Marcação imuno-histoquímica para E-caderina, observada em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

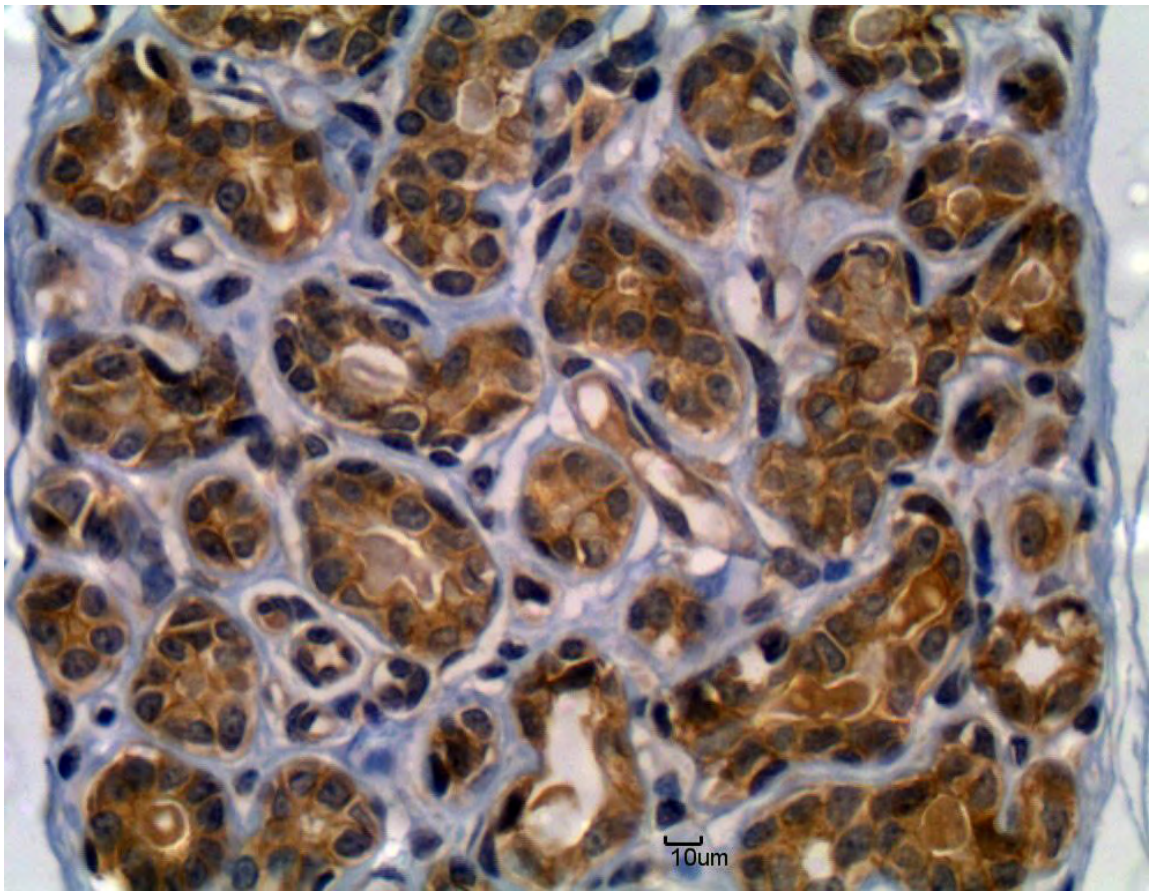

Figura 3: Glândula mamária normal de cadela (Grupo C). Marcação imuno-histoquímica para E-caderina em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

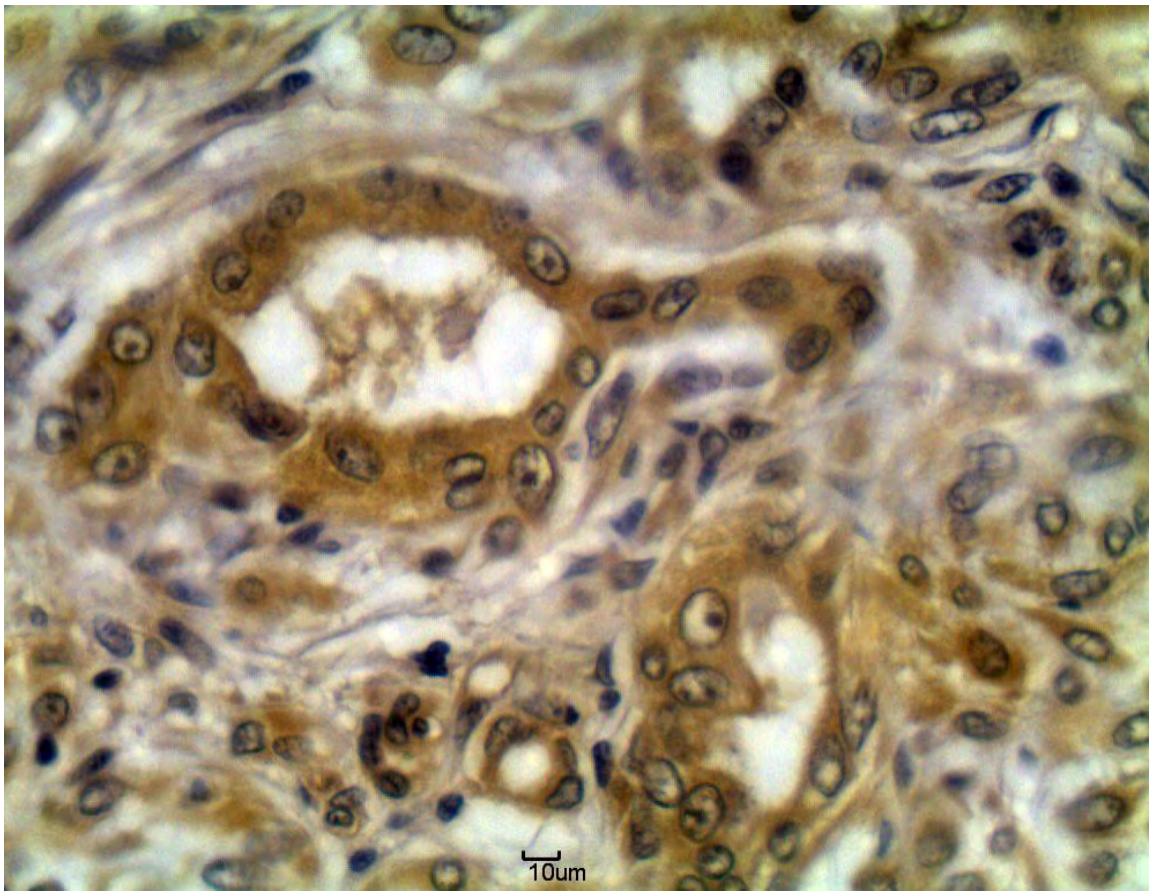

Figura 4: Neoplasia mamária sem metástase em linfonodo de cadela (Grupo N), Marcação imuno-histoquímica para MMP-9 em citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

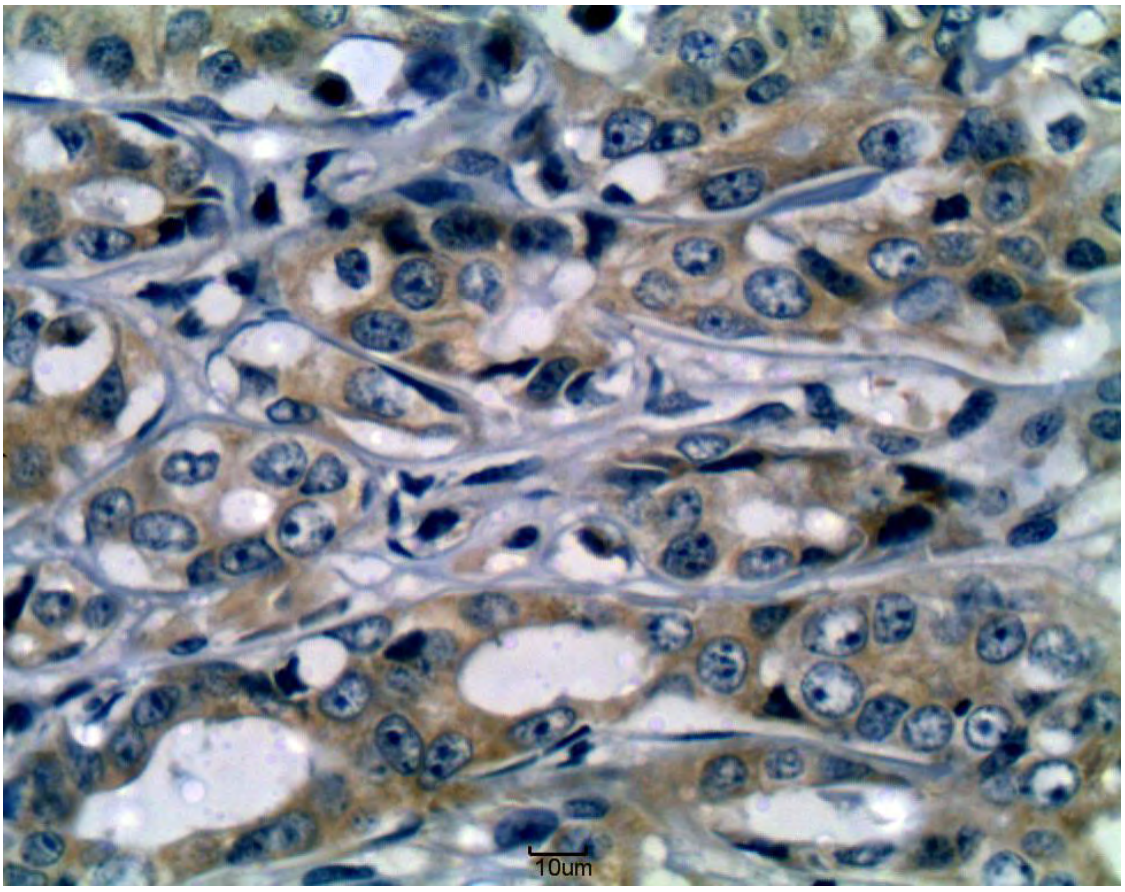

Figura 5: Neoplasia mamária sem metástase em linfonodo de cadela (Grupo N), Marcação imuno-histoquímica para MMP-9 em citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

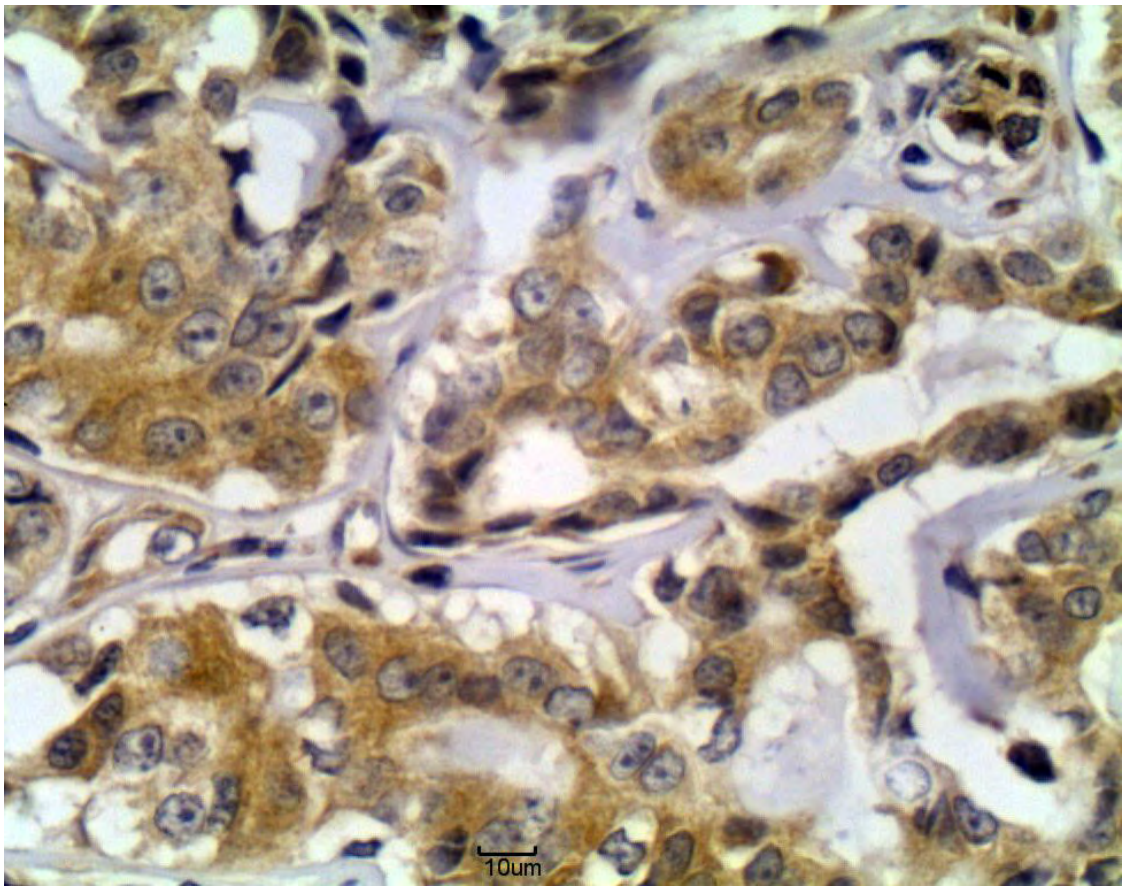

Figura 6: Neoplasia mamária sem metástase em linfonodo de cadela (Grupo N), Marcação imuno-histoquímica para VEGF em citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

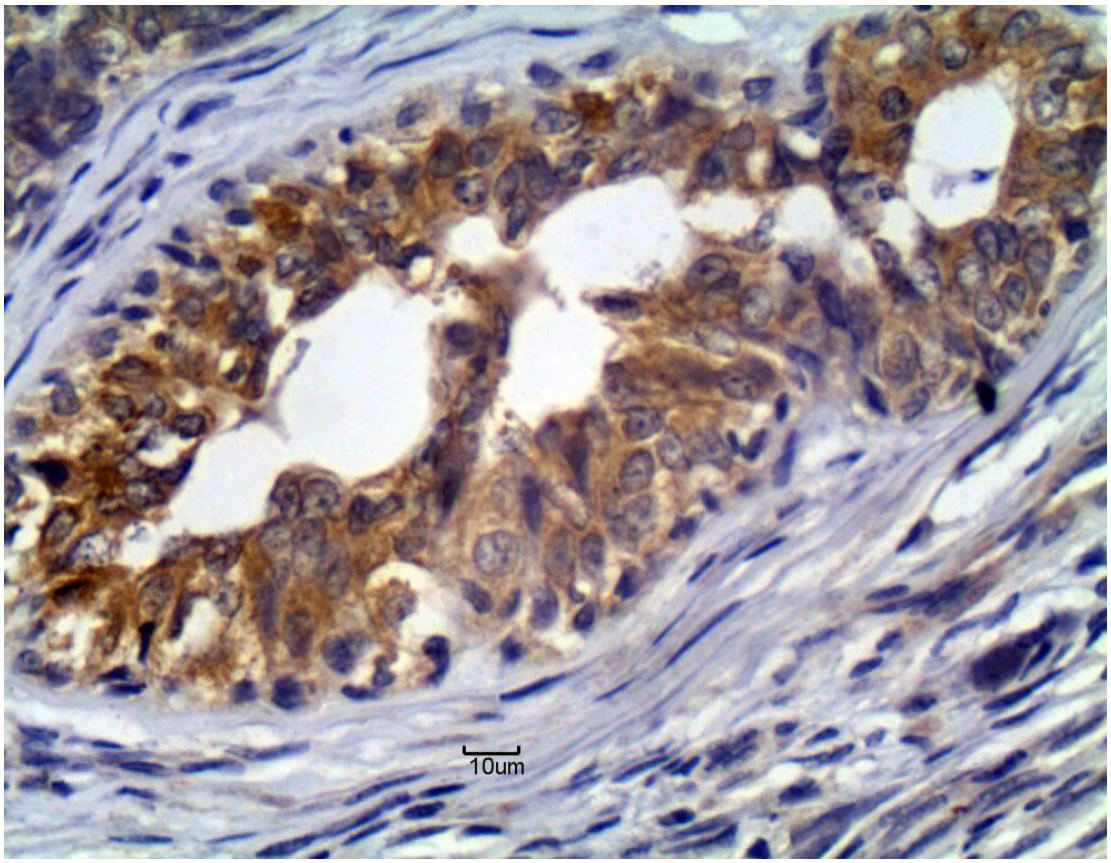

Figura 7: Sítio primário de neoplasia mamária metastática de cadela (Grupo M), Marcação imuno-histoquímica para VEGF em citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

.

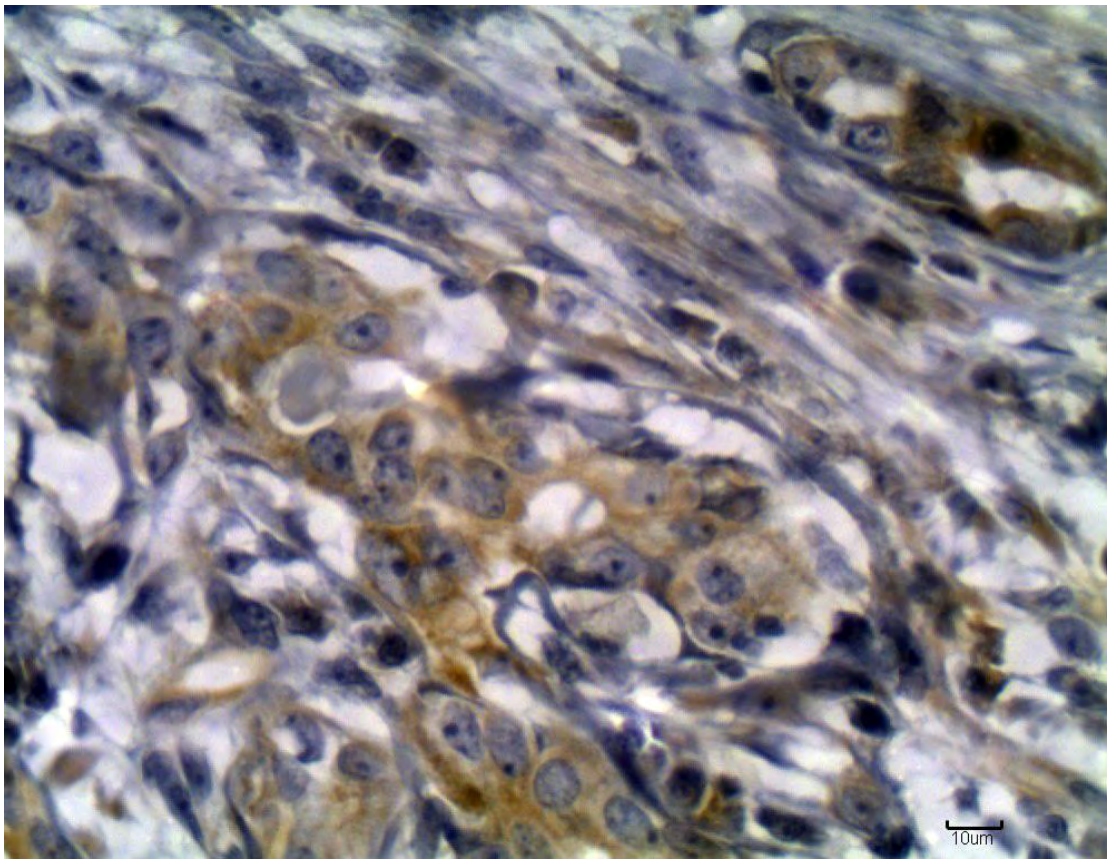

Figura 8: Neoplasia mamária sem metástase em linfonodo de cadela (Grupo N), Marcação imuno-histoquímica para CD44 em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

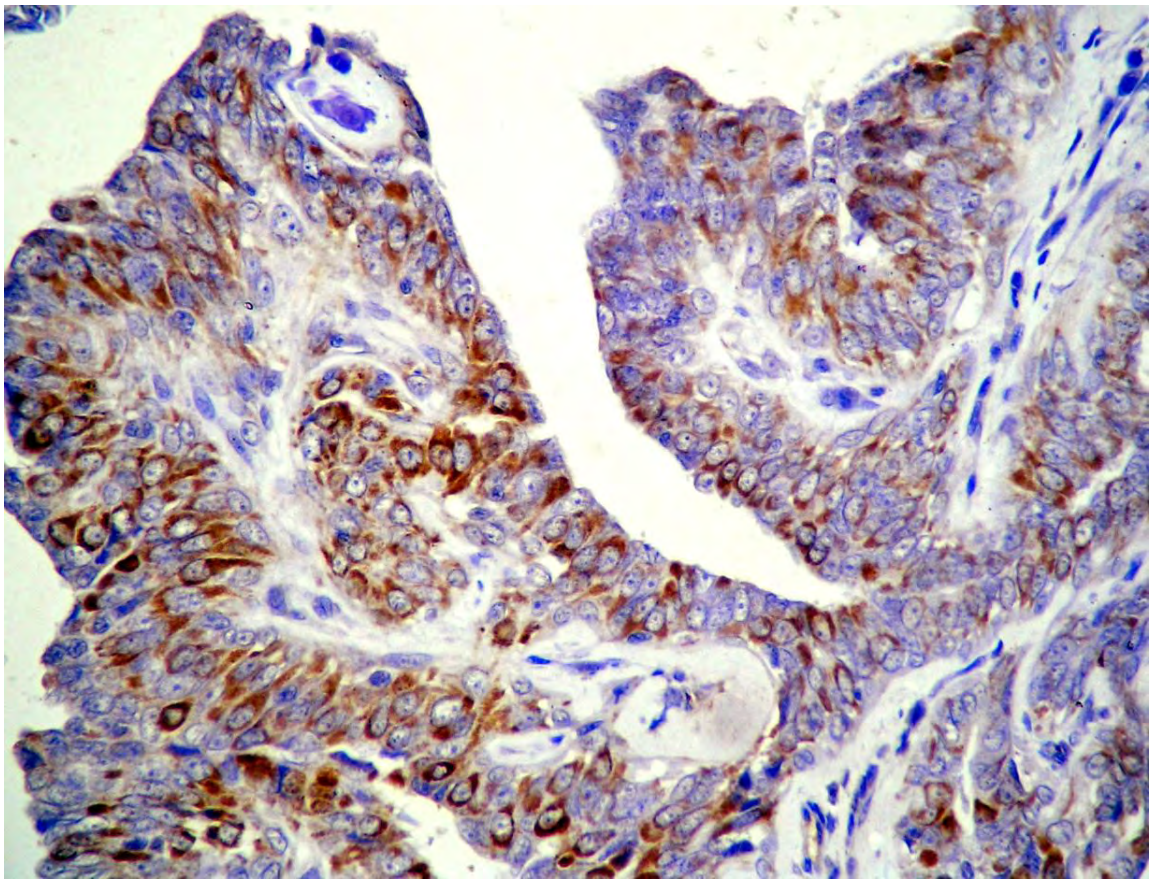

Figura 9: Sitio primário de neoplasia metastática de cadela (Grupo M). Marcação imuno-histoquímica para CD44 em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

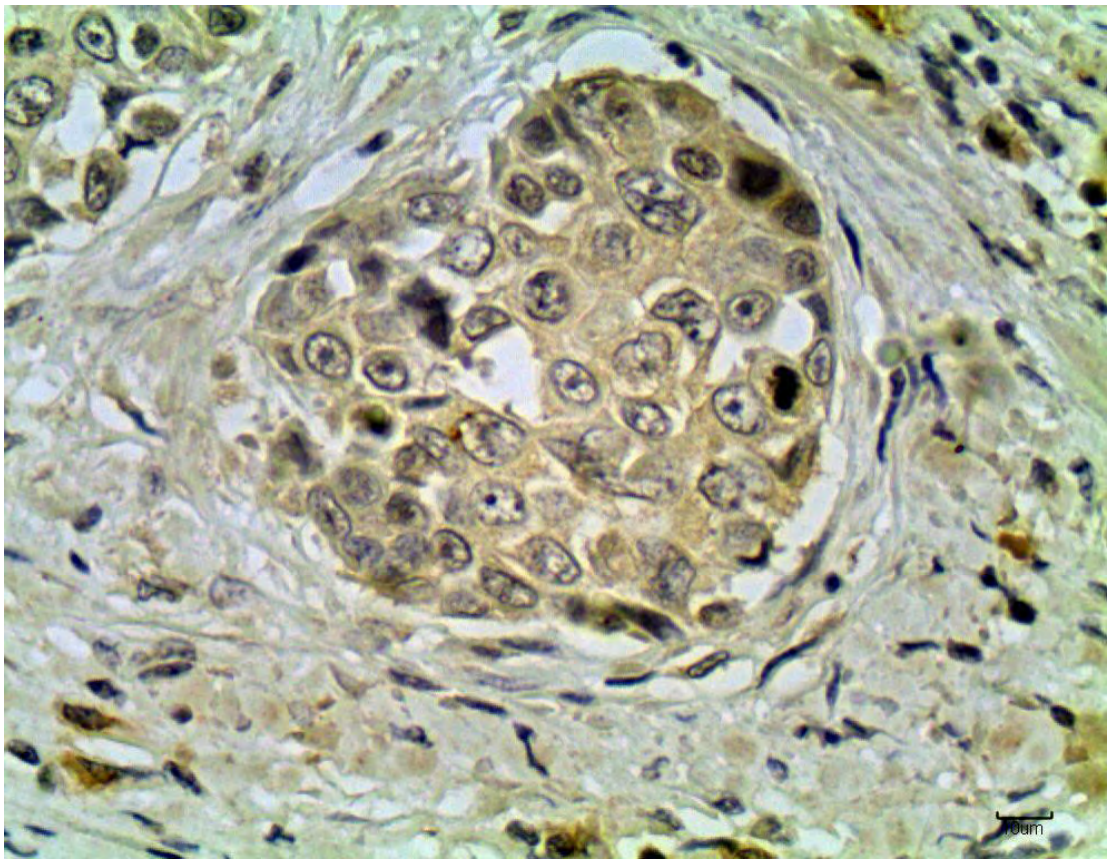

Figura 10: Êmbolo tumoral metastático de cadela (Grupo M). Marcação imuno-histoquímica para CD44 em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

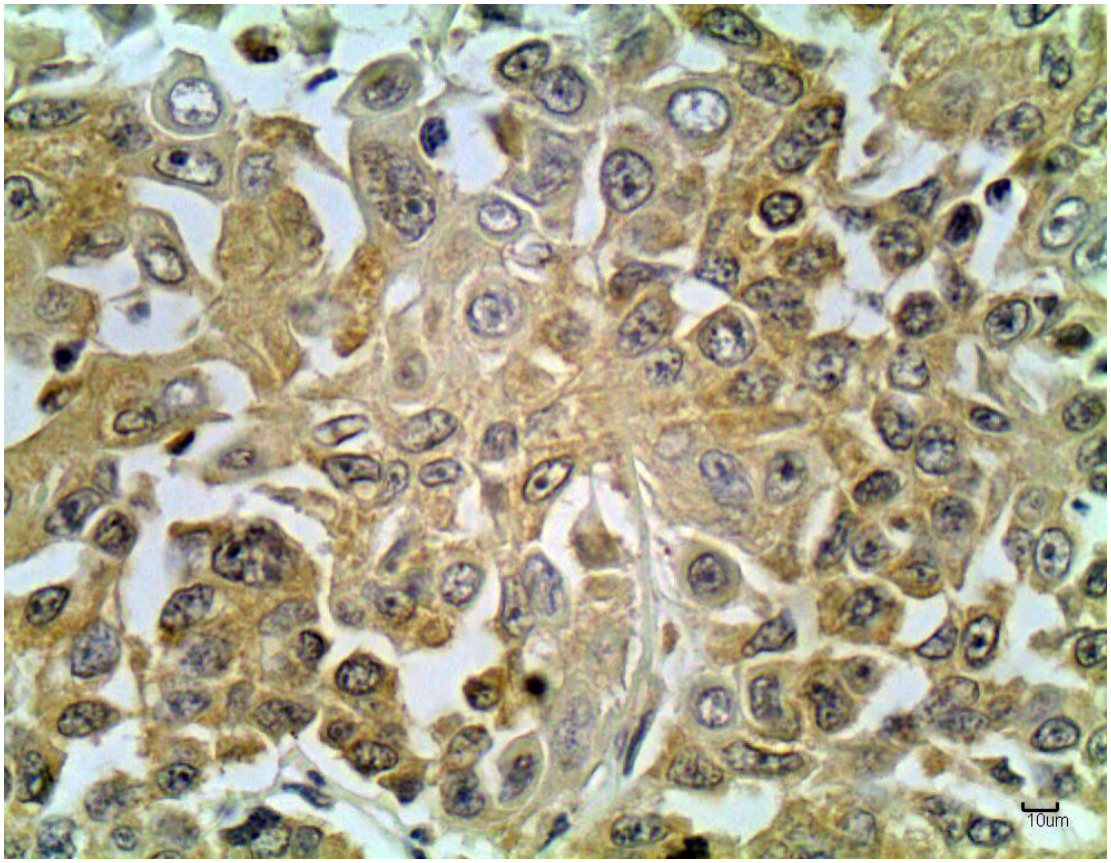

Figura 11: Metástase de células neoplásicas mamárias em linfonodo (Grupo M). As células indiferenciadas estão marcadas. Marcação imuno-histoquímica para CD44 em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

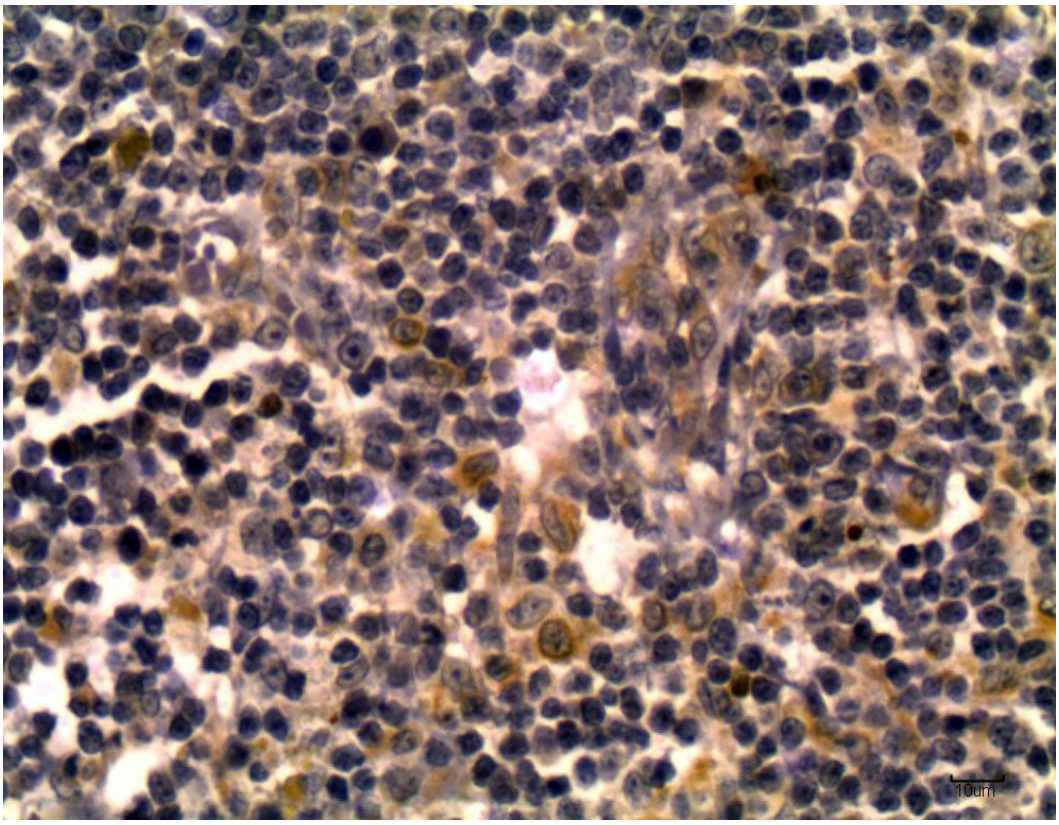

Figura 12: Linfonodo do grupo N, sem metástase visível de células epiteliais mamárias. Notar marcações em linfócitos T. Marcação imuno-histoquímica para CD44 em membrana plasmática e citoplasma de células epiteliais neoplásicas. Cromógeno DAB e contracoloração com Hematoxilina de Harris. Obj. 40x.

VI- DISCUSSÃO

Neoplasias mamárias podem se apresentar como massas isoladas ou, freqüentemente, como múltiplos nódulos, de tamanho grande e normalmente com ulcerações (POLTON, 2009). Características macroscópicas como ulceração, necrose e hemorragia estão associadas com tumores malignos e foram encontradas nos tumores metastáticos analisados neste trabalho.

Com o aumento da prevalência de câncer em caninos, há maior busca por diagnósticos precisos antes do tratamento (DAGLI, 2008). Em medicina veterinária observa-se dificuldade em comparar resultados de tipos histológicos, devido à diversidade de opiniões entre os autores em relação a características morfológicas na classificação dos tumores de mama (BENJAMIM & SAUNDERS, 1999). A classificação histológica mais aceita para os tumores em animais domésticos foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (MISDORP *et al*. 1999). Embora o tipo histológico não seja significativo para a metástase, estudos comprovam que o grau histológico tende a ser o mais objetivo indicador prognóstico de malignidade (ELSTON & ELLIS, 1991). No presente estudo, os carcinomas complexos foram predominantes nos tumores que não causaram metástase, enquanto a classificação de carcinoma simples estava presente em todos os tumores do grupo metastático. Esses dados corroboram com alguns autores (HAMPE, 1974), quando relatam que os carcinomas complexos raramente são invasivos e os carcinomas simples tendem a ser localmente invasivos, invadindo também vasos

linfáticos. Ao contrário, MOULTON (1990) afirma que essa separação entre simples e complexo é desnecessária. Segundo Polton (2009), as diferenças histológicas nos tumores de mama com padrão túbulo-papilífero e aqueles classificados como padrão sólido ou anaplásico são significantes como fatores prognósticos. Dentre as neoplasias metastáticas encontradas nesse estudo, a maioria foi classificada em carcinoma simples padrão túbulo-papilífero, sendo este tipo histológico presente na maioria dos animais que vieram a óbito. Autores relatam que entre os tipos histológicos sólido e túbulo-papilífero, o sólido seria o mais agressivo (BENJAMIM & SAUNDERS 1999). No entanto, maior atenção deve-se dar aos carcinomas em geral, considerando mais as características de invasividade do que o tipo histológico (MOULTON, 1990).

Quando há comparações entre raças, deve-se levar em consideração fatores influentes como a quantidade de raças prevalentes em regiões geográficas, a inclusão de novas raças e desaparecimento de outras. Neste sentido, pode-se comparar a raça prevalente em tumor mamário na região de Jaboticabal-SP com um estudo realizado na mesma região no ano de 1998 (DALECK *et al.* 1998). Em ambos os estudos, a raça mais acometida por tumor de mama sem metástase foi o cão sem raça definida. Já nos parâmetros de metástase, a raça predominante foi a Teckel. De fato, segundo Kelsey *et al.* (1998), animais de raça pura possuem chance duas vezes maior de desenvolver tumor de mama do que animais sem raça definida, com a mesma idade. Pode-se supor que a existência de metástase também seria maior.

Os tumores de mama em cadelas ocorrem frequentemente em países onde a castração não é realizada precocemente (SOREMO *et al.* 2000). Neste estudo, apenas uma cadela foi castrada e não foi precocemente, confirmando a influência hormonal no desenvolvimento e progressão dos tumores de mama (MOULTON, 1990). A idade média para o desenvolvimento tumoral é de 10 a 11 anos (BENJAMIM & SAUNDERS, 1999); concordando com esses autores, a idade média das cadelas deste estudo foi de 9,4 anos no grupo M e de 10,9 anos no grupo N.

Mesmo sendo um dado insuficiente para análise estatística, o fato de haver parentesco entre duas cadelas no grupo M podem indicar hereditariedade e alterações genéticas. As duas cadelas eram da raça Teckel, com metástase pulmonar, mas apresentaram tipos histopatológicos distintos. A mãe com carcinoma padrão sólido e a filha com carcinoma padrão túbulo-papilífero. Em cães da raça beagle foi estimado um grau de hereditariedade significativo para tumores de mama (BENJAMIM & SAUNDERS, 1999). Ainda em termos descritivos, duas cadelas conviviam com os mesmos fatores ambientais externos, apresentando a mesma sobrevida, mas com tipos histopatológicos distintos. Um dos fatores a ser considerado poderia ser a alimentação, mas estudos mostram que o aumento da gordura na dieta não está associado ao desenvolvimento de tumor de mama em cadelas (KELSEY *et al.*, 1998)

Metástase é um processo em que células, individuais ou em conjunto, disseminam-se de um tumor primário para um local distante (PENG *et al.*, 2007). A célula maligna precisa perder a adesão, penetrar e invadir a matriz extracelular,

entrar no sistema vascular e se aderir a um órgão distante (LOPEZ *et al.*, 2005). Uma das principais moléculas de adesão transmembrana é a E-caderina, a qual está envolvida na progressão tumoral (BRUNETTI *et al.*, 2005). Normalmente a E-caderina promove a adesão em células epiteliais normais. De fato, as células epiteliais mamárias do grupo controle foram totalmente marcadas pela E-caderina. Houve marcação de células epiteliais neoplásicas no grupo N com aumento significativo para o grupo M (Tabela 4). O sítio primário do tumor também foi marcado com aumento significativo de marcação para o grupo M em relação ao N. Autores relatam que a perda de E-caderina em tumores mamários humanos e caninos está relacionada com um pobre prognóstico (MATOS, *et al.* 2007). Em outros estudos de metástase, a marcação de E-caderina foi encontrada aumentada em tumores mamários agressivos como carcinoma inflamatório e carcinoma micropapilar invasivo (KNUDSEN e WHEELOCK, 2005). O aumento de marcação das E-caderinas no grupo das metástases pode ser devido à aderência das células no novo ambiente, para que possa estabelecer uma nova arquitetura. Portanto, a re-expressão dessa molécula de adesão por células neoplásicas depois da liberação do local primário pode ser necessária para que estas células fiquem aderidas num órgão distante (BRUNETTI *et al.*, 2003; PIEKARZ *et al.*, 2008).

A destruição da membrana basal é considerada um dos passos mais importantes para a metástase tumoral (KAWAI *et al.* 2005). Em relação ao anticorpo MMP-9, quando se comparou o grupo de tumores mamários sem metástase com o grupo de tumores metastáticos, não se obteve diferenças

significativas nas contagens de células marcadas. No grupo N, para se obter uma amostra representativa de tumores malignos, dividiu-se as neoplasias entre os 3 graus de malignidade. Já no grupo M, os graus variaram apenas entre II e III, sendo a média de contagens do sítio primário da neoplasia menor neste grupo, mas maior do que no grupo N. Houve um aumento médio de 30% com desvio padrão de 17,7 das marcações em células neoplásicas do sítio primário em relação às marcações nas células metastáticas das mesmas neoplasias mamárias. KAWAI, et al (2005) sugeriu que quanto mais agressivo for o tumor mamário maligno, maiores serão os níveis de MMPs e menores serão os níveis dos Inibidores de MMPs (TIMPs). Por esse fato, as células mais malignas estão presentes no local metastático onde há maior marcação de MMP-9. As MMPs também podem variar de acordo com o grau histológico dos tumores mamários sugerindo haver diferenças nessas patofisiologias tumorais (CASAR, *et al.* 2009). A mensuração de MMP-9 no soro de cães com tumor de mama pode ser útil para um diagnóstico precoce (YOKOTA, *et al.* 2001).

Em glândulas mamárias, o CD44v6 apresenta forte imunorreatividade em mioepitélio normal e em células epiteliais ductais (FRIEDRICHS, *et al.* 1995). Em nosso estudo, os sítios primários do tumor apresentaram menor marcação de CD44 em relação à metástase. Contrastando com os nossos achados, POZDNYAKOVA (2008) encontrou mais marcações em sítios primários de CD44v6 do que na metástase cutânea em humanos. Apesar de ser o mesmo clone do anticorpo, a metástase foi analisada em pele, enquanto o presente estudo analisou linfonodo. Nos linfonodos a maioria dos tumores metastáticos

localizava-se nos seios subcapsulares condizendo com a circulação linfática unidirecional, chegando pelos vasos aferentes e saindo pelos linfáticos do hilo, ou eferentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). A marcação superexpressa em células no interior de vasos linfáticos confere uma estabilidade na estrutura do êmbolo tumoral (MADRAZO, 2009). Fato interessante observado é que a molécula de adesão CD44 marcou uma média de 73,7% das células tumorais nos locais das metástases, indicando que a célula neoplásica necessita de adesão para enfrentar o novo microambiente que está colonizando. Muitos estudos em humanos têm proposto que o CD44 pode ser uma molécula de fator prognóstico de metástase (XIN, 2001). Em cães, há necessidade de estudos complementares para que fique clara essa hipótese. Segundo os resultados do presente trabalho, a marcação da molécula de adesão CD44 pode ser considerada um fator prognóstico, sendo desfavorável quando há redução em sua expressão em tumores mamários malignos primários.

Uma das funções da molécula CD44 é a ativação de linfócitos T (LOOI *et al.* 2006). Na resposta inflamatória, o CD44 inicia o caminho primariamente, ativando os linfócitos T para saída dos vasos para vários tecidos inflamados (SIEGELMAN et al, 2000). Os exons V6 e V9 estão envolvidos nessa sinalização de linfócitos (HAMILTON, et al 2007). Como a variante V6 está envolvida tanto na metástase quanto na ativação de linfócitos, autores tentam relacionar o mecanismo pelo qual o CD44 ativa linfócitos T para o local da inflamação com o mecanismo das células tumorais para o local da metástase (HERRLICH *et al.* 1993). Neste estudo, a marcação em linfócitos T em linfonodos negativos para metástase foi

significantemente maior do que a marcação em linfonodos positivos para a metástase. Este resultado sugere que a resposta imune pode estar envolvida no processo de metástase. As respostas imunes adaptativas são mediadas por anticorpos e por linfócitos T, que compõem os mecanismos efetores capazes de matar células tumorais *"in vitro"* (ABBAS *et al.*, 2004). Provavelmente, quando a molécula CD44 está envolvida na metástase há uma diminuição de linfócitos T, pois estes atuam como agressores das células tumorais, impedindo a sua sobrevivência. Até o presente momento não se encontrou estudos associando o CD44 com a metástase e linfócitos T. Postula-se aqui ser o linfócito T um fator indicativo de prognóstico. A reduzida ou nula marcação de linfócitos T pelo CD44v6 em linfonodos drenantes de tumores mamários pode ser indicativo de futura presença de metástase. Ao contrário, se houver marcação abundante de linfócitos T, provavelmente não haveria metástase nesse linfonodo por este tumor.

Um dos objetivos deste trabalho foi comparar a marcação da molécula de adesão CD44 em tumores mamários malignos caninos com suas respectivas metástases tentando relacioná-las com fatores prognósticos já conhecidos. Estudos *in vitro* sugerem que o CD44 desempenha um papel importante na migração e invasão tumoral. No entanto, a complexidade dessa molécula, por apresentar vários isoformas, tem causado dificuldades em apresentar respostas a esse respeito. Assim, há várias explicações na literatura científica (LOOI *et al.*, 2006). A investigação do envolvimento da molécula de adesão CD44 com outros mecanismos celulares certamente contribuirá para o avanço da pesquisa com câncer (LOOI *et al.*, 2006). Recentemente, autores mostram que há uma

interação do CD44 com a MMP-9 na promoção da metástase. Peng *et al.* (2007) relataram que o CD44 induz a expressão de MMP-9 nas membranas celulares de células neoplásicas mamárias e que os receptores de CD44 são usados como locais de distribuição de MMP-9, para esta exercer a sua atividade proteolítica, estimulando assim a metástase. Neste estudo, observou-se que houve um aumento de marcação tanto do CD44 quanto da MMP-9 nos locais da metástase, sugerindo que essas moléculas podem estar agindo concomitantemente na metástase. Em relação a E-caderina, embora autores relatem que alta expressão desta possa inibir a ligação do CD44 com o HA, diminuindo assim a motilidade celular (YIN & QIN, 2003), neste estudo, o aumento da E-caderina e da molécula de adesão CD44 foi significativo ($p<0,05$) tanto em relação ao grupo N para o grupo M e também do sítio primário para a respectiva metástase, sendo ambas importantes nesse processo. As marcações para o anticorpo VEGF não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos grupos. Tanto as marcações no grupo N como no M foram relativamente altas. Embora seja um pequeno aumento e não significativo por métodos estatísticos, parece haver a formação de novos vasos nos locais da metástase do que em tumores malignos primários. Talvez o CD44 possa estar interferindo neste aumento: como já foi descrito, o CD44 pode ser uma molécula promissora na modulação da angiogênese (LOOI *et al.*, 2006)

VII - CONCLUSÕES

1. A menor marcação em células epiteliais neoplásicas nos tumores mamários malignos com o anti-CD44 pode ser um fator prognóstico desfavorável.

2. A investigação de marcações em linfócitos T para o CD44 no linfonodo drenante do tumor maligno mamário pode ser um bom fator prognóstico. Um número elevado de células marcadas indica prognóstico favorável.

3. O tempo de sobrevida dos animais do grupo dos tumores mamários com metástase em linfonodos foi de sete meses; os que não tinham metatástase tiveram sobrevida superior a 12 meses.

4. O tipo histológico predominante dos tumores mamários metastáticos foi o carcinoma simples padrão túbulo papilífero grau II; o tipo predominante entre os não metastáticos foi o carcinoma complexo.

5. A molécula CD44 pode estar agindo em conjunto com outros fatores como a MMP-9 e a E-caderina devido aos resultados terem sido muito parecidos entre essas três moléculas.

VIII - REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Celular and Molecular immunology**. 4th edition, Saunders: Philadelphia, p. 553, 2000.

ANKIT BHARAT,M.D., FENG GAO, PH.D.,JULIE A. MARGENTHALER,M.D. Tumor characteristics and patient outcomes are similar Between invasive lobular and mixed invasive ductal/lobular breast cancers but differ from pure invasive ductal breast cancers. **The American Journal of Surgery**, v.198, p. 516–519,2009.

BENJAMIN S. A.; LEE A. C.; SAUDERS W.J. Classification and Behavior of Canine Mammary Epithelial Neoplasms Based on Life-span Observations in Beagles. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 423-436, 1999.

BOURGUIGNON, L.Y.W., SINGLETON, P.A., ZHU, H.; DIEDRICH, F. Hyaluronan-mediated CD44 iterection with RhoGEF and Rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.29420-34, 2003.

BOUSQUET G, CONFAVREUX C, MAGNÉ N, DE LARA CT, POORTMANS P, SENKUS E, DE LAFONTAN B, BOLLA M, LARGILLIER R, LAGNEAU E, KADISH S, LEMANSKI C, OZSAHIN M, BELKACÉMI Y Outcome and prognostic factors in breast sarcoma: a multicenter study from the rare cancer network. **Radiotherapy and Oncology,** v. 85, n. 3, p. 355—61, 2007**.**

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; LEPROTTI, S.; BENAZZI, C. E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. **Journal of Veterinary Medicine**. Series A, v.50, p.496-500, 2003.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; MONARI, I.; BENAZZI, C. E-cadherin and β-catenin reduction infuence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.42, p.781-787, 2005.

CASAR, J.M.D.; GONZÁLEZ-REYES, S.; GONZÁLEZ, L.O.; GONZÁLEZ, J.M.; JUNQUERA, S.; BONGERA, M.; GARCÍA, M.F.; ANDICOECHEA, A.; SERRA, C.; VIZOSO, F.C. Expression of metalloproteases and their inhibitors in diVerent histological types of breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology,** 15 de nov, 2009.

CASSALI, G. D.; GOBBI, H.; MALM, C.; SCHMITT, F. C. Evaluation of Accuracy of Fine Needle Aspiration Cytology for Diagnosis of Canine Mammary Tumorus: comparative features with human tumours. **Cytopathology**, v. 18, p. 191-196, 2006.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J.; WONG, M. L. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dog with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 10, p. 1625-9, 2005.

Cohen, D.; Reif, J.S.; Brody, J. Epidemiologic analyses of the most prevalent sites and types of canine neoplasia in a veterinary hospital. **Cancer Research**, v.34, p.2859-68, 1974.

DAGLI, M. L. Z. The search for suitable prognostic marker for canine mammary tumors: A promising Outlook. **The Veterinary Journal**, v.177, p. 3-5, 2008.

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

DIAZ, L.K.; ZHOU, X.; WRIGHT, E.T.; CRISTOFANILLI, M.; SMITH, T.; YANG, Y.; SNEIGE, N.; SAHIN, A.; GILCREASE, M.Z. CD44 expression is associated with increased survival in node negative invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.9, p. 3309-14., 2005.

FRIEDRICHS, K.; FRANKE, F.; LISBOA, B. W.; KUGLER, G.; GILE, I. TERPE, H. J.; HOLZEL, F.; MAASS, H.; AND GUNTHERT U. CD44 isoforms Correlate with Cellular Differentiation but not with prognosis in Human Breast Cancer. **Cancer Research,** v.55, p. 5424-5433, 1995.

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

FOWLER, E.H.; WILSON, G.P.;, KOESTNER, A. Biologic behavior of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification. **Veterinary Pathology.** V. 11, n. 3, p. 212-229, 1974.

FU, O.Y.; HOU, M.F.; YANG, S.F.; HUANG, S.C.; LEE, W.Y. Cobalt chloride-induced hypoxia modulates the invasive potential and matrix metalloproteinases of primary and metastatic breast cancer cells. **Anticancer Research**. v. 29, n. 8, p. 3131-8, 2009.

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

GOTTE, M.; AND YIP, G.W. Heparanase, Hyaluronan, and CD44 in Cancers: A Breast Carcinoma Perspective. **Cancer Research** v. 66, n. 21, 2006; November 1, 2006.

Hamilton, S.R.; Fard, S.F.; Paiwand, F.F.; Tolg, C.; Veiseh, M.; Wang, C.; MacCarthy, J.B.; Bissel, M.J.; Koropatnick, J.; Turley, E.A. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1, 2 That sustain high basal motility in breast cancer cells. **The Journal of Biological chemistry**, v.262, n.22, p.16667-80, 2007.

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

HARRELL, J.C.; DYE, W.W.;ALLRED, D.C.; JEDLICKA, P.,.SPOELSTRA, N.S.; SARTORIUS, C.A.; AND HORWITZ, K.B. Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Metastasis: Altered Hormonal Sensitivity and Tumor Aggressiveness in Lymphatic Vessels and Lymph Nodes. **Cancer Research** v.66, n.18, September 15, 2006.

HEBBARD, L.; STEFFEN, A.; ZAWADZKI, V.; FIEBER, C.; HOWELLS,N.; MOLL, J.PONTA,H.; HOFMANN, M.; AND SLEEMAN||, J. CD44 expression and regulation during mammary gland development and function. **Journal of Cell Science** v.113, p.2618-2630, 2000.

HERRLICH, P.; ZOLLER, M.; PALS, S.T.; PONTA, H. CD44 slice variants: metastases meet lymphocytes. **Immunology Today**, v. 14, n. 8, p.395-398, 1993.

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

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO, J. in **Histologia Básica**, Ed.Guanabara, nona edição, 427p,1999.

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

KATO, Y.; ASANO, K.; MOGI, T.; KUTARA, K.; TESHIMA, K.; EDAMURA, K.; TSUMAGARI, S.; HASEGAWA, A.; TANAKA S. Clinical significance of circulating Vascular Endothelial Growth Factor in dogs with mammary gland tumors. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 69. n. 1, p.77-80, 2007.

KAWAI, K.; UETSUKA, K.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. The activity of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) in Mammary Tumor of dogs and Rats. **The Journal of Veterinary Medicine and Science,** v.68, n.2, p.105-111, 2006.

KELSEY, J. L.; MOORE, A. S.; GLICKMAN, L.T. Epidemiologic Studies of Risk Factors for Cancer in Pet Dogs. **Epidemiologic Reviews**. v. 20, n.2, p. 204-207. 1998.

KENNEDY, P.C. & MILLER, R. B.; The Female Genital system, In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; Palmer, N. **Pathology of Domestic Animals**. 4th ed., cap.4, p.349-469, 1993.

KLINGBEIL, P.; NATRAJAN, R.;EVERITT, G.; VATCHEVA, R.; MARCHIO, C.;PALACIOS, J.;BUERGER, H.;.REIS-FILHO, J.S.;.ISACKE, C.M. CD44 is over expressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. **Breast Cancer Research and Treatment**. P.95-109, 2009.

KNUDSEN K.A.; WHEELOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular. Biochemestry**, v.95, p.488-496, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 7ª. Edição, cap. 7, p. 281-356. Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, 2005.

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

KUO,Y-C.; SU, C-H.; LIU, C-Y. ; CHEN, T-H. ; CHEN, C-P. ; WANG, H-S. Transforming growth factor-b induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type1-matrix metalloproteinase. **International.Journal of.Cancer**. v. 124, p. 2568–2576, 2009.

KUSEWITT, D.F. & RUSH, L.J. Neoplasia and tumor biology. In: McGavin, M.D. & Zachary, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007, p.294-295.

LAS MULAS J. M.; MILLA´N Y.; DIOS R. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor a and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Diseasefree Period in Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 200-212, 2005.

LESTER, S. C. A MAMA; IN: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 7a. edição, cap. 23, p.1169-1206. Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, 2005.

LOOI, L.M.; CHEAH, P.L.; ZHAO, W.; NG, M.H.; YIP, C.H. CD44 expression and axillary lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma of the breast. Malaysian **Journal Pathology**, v. 28, n. 2, p. 83086, 2006

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

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

MATOS, J.F.; FAUSTINO, A.M.; LOPES, C.; RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F. Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining. **Veterinary Record**. v. 6, n. 18, p. 626-30, 2006.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.C.C.; FAUSTINO, A.M.R.; CARVALHEIRA, J.G.V.; RUTTEMAN, G.R.; Gartner, M.R.M. E-caderin, B-catenin, invasion and lymph node metastases in canine malignant mammary tumours. APMIS: **acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica**, v.115, p.327-34, 2007.

MISDORP, H.; ELSE, R.; HELLMAN, E., Histologic classification of mammary tumors of the dog and cat. In: **World Health Organization Internacional Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**, Series 2, v. 7, nº 2, Armed Forces Institute of Pathology Washington DC, 1999.

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

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

NAOR, D.; SIONOV, R.V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process **Advances in Cancer Research.** v. 71, p. 241-319, 1997

OKA, H.; SHIOZAKI, H.; KOBAYASHI, K.; INOUE, M.; TAHARA, H.; KOBAYASHI, T.; TAKATSUKA, Y.; MATSUYOSHI, N.; MIRANO, S.; TAKEICHI, M.; AND MORI, T. Expression of E-Cadherin Cell Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Tissues and Its Relationship to Metastasis. **Cancer Research**. V. 5, n. 1, p. 1696-1701, 1993.

OWEN, L. N. A comparative study of canine and human breast cancer. **Investigative Cell Pathology,** v. 2, p. 257-275, 1979.

PACOR,S.; ZORZET, S.; COCCHIETTO, M.; BACAC, M.; VADORI, M.; TURRIN, C.; GAVA, B.; CASTELLARIN, A.; AND SAVA, G. Intratumoral NAMI-A Treatment Trigger Metastasis Reduction, Which Correlates to CD44 Regulation and Tumor Infiltrating Lymphocyte Recruitment. **The Journalof Pharmacologyand Experimental Therapeutics**. v.3, n.2, p. 737-744, 2004.

PELETEIRO, M.C.Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. LXXXIX, n.509, p.10-29, 1994.

PENG,S. T.; SU, C.H.; KUO, C.C.; SHAW, C.F. , WANG, H.S. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. **International Journal Of Oncology** v.31, p. 1119-1126, 2007

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

PIEKARZ, C. H. BIONDO, A. W. AMORIM, R. L.RODASKI, S.BARROS FILHO, I. R. DE NARDI, A. B. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.13-21, 2008

POLTON, G. Mammary tumor in dogs. **Irish Veterinary Journal**, v.62, n.1, p. 50-56, 2009.

POZDNYAKOVA, O.; HOANG, M.M.; DRESSER, K.A.; MAHALINGAM, M. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, CD44v6, and HER2/neu in

metastatic cutaneous adenocarcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medice**. V. 133, n. 8, p.1285-90, 2009

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; ECZUB, S.; DELPIERO, F.; DIAL, S.; .EHRHART, E.J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.; WEST, K. Suggested guidelines fo rimmunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v.20, p.393–413, 2008.

RESTUCCI, B.; DE VICO, G.; AND MAIOLINO, P. Evaluation of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors by Quantitative Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology** v. 37, p. 297–301, 2000.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.39, p.488-493, 2002.

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

SHAH, F.D.; SHUKLA, S.N.; SHAH, P.M.; SHUKLA, H.K.; PATEL, P.S. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. **Indian Journal of Cancer,** v 46, july-september, n.3, 2009.

SHERIDAN, C.; KISHIMOTO, H.; FUCHS, R. K.; MEHROTRA, S.; BHAT-NAKSHATRI, P.; TURNER, C.H.; GOULET, JR R.; BADVE, S.; NAKSHATRI, H. CD44+/CD24– breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. **Breast Cancer Research**, v.8, n.5, p, R59. 2006.

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

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

SCHNCIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors influcncing mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, p. 1249-1261, 1969.

SIEGELMAN, M.H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44- iniciated pathway of T-cell extravasasion uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **Journal of Clinocal Investigation**, v. 105, p. 683-691, 2000.

SOARES,C.T.; FREDERIGUE-JUNIOR,U.; DE LUCA, L.A. Anatomopathological Analysis of Sentinel and Nonsentinel Lymph Nodes in Breast Cancer: Hematoxylin-Eosin Versus Immunohistochemistry. **International Journal of Surgical Pathology**. V.15, n. 4, p. 358-368, 2007.

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

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

XIN Y, GRACE A, GALLAGHER MM, CURRAN BT, LEADER MB, KAY EW. CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. **Applied Immunohistochemistry Molecular Morphology**, v. 9, n. 2, p. 138-142, 2001.

YIN, X,; QIN, Y. E- caderin negativaly regulates CD44- Hyaluronan interection and CD44 mediated tumor invasion and branching morphogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n.10, p.8661-68, 2003.

YOKOTA, H.; KUMATA, T.; TAKETABA, S.; KOBAYASHI, T.; MOUE, H.; TANIYAMA, H.; HIRAYAMA, K.; KAGAWA, Y.; ITOH, N.; FUJITA, O.; NAKADE, T.; YUASA, A. High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1568, p. 7-12, 2001.