

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO EM
CARCINOMA ESPONTANEO DE MAMA EM CADELAS E SUA
CORRELAÇÃO COM O GRAU DE AGRESSIVIDADE NOS
DIFERENTES SUBTIPOS DE TUMORES**

FERNANDA CARMELLO FIGUEIROA

BOTUCATU – SP

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO EM
CARCINOMA ESPONTANEO DE MAMA EM CADELAS E SUA
CORRELAÇÃO COM O GRAU DE AGRESSIVIDADE NOS
DIFERENTES SUBTIPOS DE TUMORES**

FERNANDA CARMELLO FIGUEIROA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Livre Docente Noeme Sousa
Rocha

Co-Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro da
Silva

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Figueiroa, Fernanda Carmello.

Expressão de marcadores de células-tronco em carcinoma espontâneo de mama em cadelas e sua correlação com o grau de agressividade nos diferentes subtipos de tumores / Fernanda Carmello Figueiroa. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Alfredo Ribeiro Silva

Capes: 50503022

1. Cão – Doenças. 2. Mamas – Câncer. 3. Câncer em cão. 4. Células-tronco. 5. Tumores.

Palavras-chave: Cadelas; Câncer de mama; Células-tronco tumorais; Subtipos de tumores de mama; *Tissue microarray*.

Comissão Examinadora

Nome do Autor: Fernanda Carmello Figueiroa

Título: EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO EM CARCINOMA ESPONTANEO DE MAMA EM CADELAS E SUA CORRELAÇÃO COM O GRAU DE AGRESSIVIDADE NOS DIFERENTES SUBTIPOS DE TUMORES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Livre Docente Noeme Sousa Rocha
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária – Serviço de Patologia Animal
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Livre Docente Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof^a. Ass. Dr^a. Carla Adriene da Silva Franchi
Membro
Departamento de Patologia
FMB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
Membro
Departamento de Morfologia
IBB – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha
Membro
Departamento de Anatomia Patológica
Hospital do Câncer de São Paulo – Fundação Antônio Prudente – São Paulo

Data da Defesa: 23 de novembro de 2012.

Dedicatória

Dedico...

*A Deus, por abençoar minha vida,
iluminar meus caminhos e
me dar forças pra continuar!*

*Aos meus amados pais, **Carlos Eduardo**
e **Iolanda**, pela dedicação e amor
incondicional, por me ensinarem
os verdadeiros valores da vida e
me apoiarem em todas as horas.*

*À **Beatriz**, minha irmã querida,
pelo apoio, pela torcida, por toda a ajuda
e por sempre estar presente.*

*Às minhas cachorras já falecidas, **Tina**, **Cindy** e
Boneca, portadoras de câncer de mama.
Vocês fizeram parte da minha vida e
me inspiraram a estudar mais
a fundo essa doença.*

*Às minhas cachorras **Phoebe, Meg,**
Pituka e Nina. Pelo companheirismo,
amor e por todos os momentos
de alegria.*

*A todos os animais que sejam portadores ou que
venham a desenvolver câncer de mama.
Que este estudo ajude a guiar novos caminhos,
melhorar o diagnóstico, prognóstico, tratamento e a
qualidade de vida!*

Agradecimientos

Serei eternamente grata...

À Professora Livre Docente Noeme Sousa Rocha, minha querida orientadora. Agradeço pela disponibilidade em me orientar, pelos ensinamentos, pelos “puxões” de orelha, pela paciência, apoio e pela grande amizade.

Ao Professor Dr. Alfredo Ribeiro da Silva, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, obrigada por ser meu coorientador e me aceitar como estagiária no SERPAT/HC/Ribeirão Preto/SP e no Laboratório de Oncopatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal – FMRP/USP/Ribeirão Preto/SP. Agradeço pela orientação, pelas sugestões, incentivo e ajuda na interpretação dos dados.

*À técnica de laboratório Ana Maria Anselmi Dorigan, por me receber no SERPAT/HC/Ribeirão Preto/SP e me ensinar a técnica de CISH e FISH (hibridização *in situ*), além de me auxiliar na marcação imunoistoquímica de alguns marcadores.*

À técnica de laboratório Deisy Mara da Silva, por me receber no Laboratório de Oncopatologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal – FMRP/USP/Ribeirão Preto/SP, por todos os ensinamentos, pelos momentos de descontração, pela paciência e amizade. Agradeço pelo auxílio prestado nas marcações imunoistoquímicas das células-tronco tumorais. Você foi fundamental nesse trabalho!

À equipe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo/São Paulo/SP, da Fundação Antônio Prudente, em especial ao Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha e ao Carlos Nascimento pela confecção do TMA.

À Márcia Moleta Colodel pelo auxílio na coleta e processamento das amostras. Graças a sua dedicação conseguimos material suficiente para nossas teses.

Ao Breno Souza Salgado, agradeço pela ajuda nas marcações imunoistoquímicas e na interpretação dos dados.

Aos funcionários da pós-graduação em Medicina Veterinária– FMVZ/UNESP/Botucatu/SP José Roberto de Lalla Júnior, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel, Patrícia Luciane Souza Ramos, pela atenção e ajuda.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP/Botucatu/SP, pela oportunidade de desenvolver esse projeto; ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, por todo auxílio, ao Departamento de Clínica Veterinária e ao Serviço de Patologia Veterinária pela acolhida.

Ao Professor Adjunto José Eduardo Corrente, pelo auxílio prestado na análise estatística.

À Professora Regina Kiomi Takahira, por me auxiliar na interpretação dos dados estatísticos.

Aos amigos de pós-graduação da Patologia Veterinária: Isabelle, Luciano, Mariana, Marcela. Em especial ao Paulo Ricardo, pela grande amizade,

auxílio, apoio, companheirismo e momentos de descontração.

*Aos pós-graduandos do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP/USP/Ribeirão Preto/SP, em especial à **Juliana da Silva Zanetti**, pela amizade, colaboração, auxílio, apoio e momentos de descontração.*

*Aos amigos e colegas da CEF, Ag. Vila dos Lavradores e Ag. Marília, em especial à **Patricia, Rosângela, Arnaldo, Fernando, Diogo, Vitor e Marcos**. Obrigada por me apoiarem, suprir minhas ausências e torcerem pela finalização deste trabalho.*

*Aos meus amigos-irmãos, **Bolinha, Banana, Betinho, Lello, Samantha, Thaís, Flávia**, obrigada por toda compreensão, apoio, amizade, cumplicidade, momentos de descontração. A vida é muito mais feliz com vocês ao meu lado.*

A todos os proprietários que gentilmente permitiram que o tecido neoplásico retirado cirurgicamente de suas cadelas fosse estudado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização dessa pós-graduação e desse projeto de pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos!!!

Muito Obrigada!!!

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos (Ac) utilizados nas marcações imunoistoquímicas: Diluição, fabricante, clone utilizado e ponto de corte para avaliar a positividade de cada marcador.....	31
Tabela 2 -	Teste qui-quadrado (χ^2) para diferença de proporções e para a associação entre os subtipos para cada marcador de células-tronco nos carcinomas simples e complexo.....	44

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistemas de células-tronco: Tecido normal descende de uma célula-tronco central que cresce e se diferencia para criar células progenitoras e células maduras. As características chave das células-tronco normais são a habilidade de auto-renovação (indicada pela seta curva), potencial de multi-diferenciação (indicada pelas células de diferentes cores) e sua capacidade proliferativa extensa. As células-tronco tumorais surgem a partir de mutações nas células-tronco normais ou nas progenitoras, que crescem e se diferenciam para produzir o tumor primário. Assim como as células-tronco normais, as células-tronco tumorais podem se auto-renovar, dar origem a uma população heterogênea de células filhas e se proliferar incessantemente (Modificado de Jordan <i>et al.</i> , 2006)	18
Figura 2 -	Cenários envolvendo células-tronco tumorais: A- Mutação de célula-tronco normal pode criar célula-tronco tumoral, a qual irá gerar um tumor primário. B- Tumor primário tratado com quimioterápicos pode ter maioria das células destruída, mas se alguma célula-tronco tumoral não for erradicada o tumor tornará a crescer causando recidiva local. C- Células-tronco tumorais decorrentes do tumor primário podem emigrar para sítios distantes e criar lesões metastáticas (Modificado de Jordan <i>et al.</i> , 2006).....	24
Figura 3 -	A) Marcação nuclear para receptores de estrógeno em carcinoma simples de mama, 200X. B) Marcação membranar para HER-2 em carcinoma simples de mama, positivo 3+, marcação completa de membrana, IHQ – Novolink®, 200X.....	36
Figura 4 -	A) Marcação nuclear para p63 em carcinoma complexo de mama, evidenciando células mioepiteliais, 200X. B) Marcação membranar para CK5 em carcinoma complexo de mama, IHQ – Novolink®, 200X.....	37
Figura 5 -	Marcação citoplasmática para CD10 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	39
Figura 6 -	Marcação citoplasmática para BMI-1 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	40
Figura 7 -	Marcação citoplasmática para CD24 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	40
Figura 8 -	Marcação membranar para ESA em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	41
Figura 9 -	Marcação citoplasmática para MUC-1 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	41
Figura 10 -	Marcação membranar para CD44 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.....	42

Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
2.1 Câncer de mama.....	10
2.2 Subtipos tumorais.....	11
2.3 <i>Tissue microarray</i> (TMA).....	14
2.4 Células-tronco.....	14
2.5 Células-tronco tumorais.....	16
2.6 Células-tronco tumorais em câncer de mama.....	18
2.7 Alvos terapêuticos contra células-tronco tumorais.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL E METODOS.....	27
4.1 Regulamentação do estudo.....	28
4.2 Seleção das amostras.....	28
4.3 Diagnóstico histopatológico.....	28
4.4 Construção do <i>Tissue microarray</i> (TMA).....	29
4.5 Imunoistoquímica.....	30
4.6 Leitura das lâminas.....	31
4.7 Classificação imunoistoquímica das amostras.....	33
4.8 Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Classificação histopatológica.....	35
5.2 Classificação em subtipos.....	35
5.3 Marcação das células-tronco tumorais.....	38
5.4 Análise estatística.....	42
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1 Subtipos de tumores de mama.....	46
6.2 Marcadores de células-tronco tumorais.....	47
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	55
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	70
ANEXOS.....	83
Anexo I.....	84
Anexo II.....	85

Resu m o

FIGUEIROA, F.C. Expressão de marcadores de células-tronco em carcinoma espontâneo de mama em cadelas e sua correlação com o grau de agressividade nos diferentes subtipos de tumores. Botucatu, 2012. 105p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Por ser a maior causa de morte entre as fêmeas caninas, o câncer de mama desperta o interesse da comunidade científica, pois sua apresentação e evolução clínica são muito semelhantes aos casos de câncer de mama na mulher. No intuito de permitir a continuação dos estudos comparativos entre os tumores de cadelas e os das mulheres, foram realizadas as marcações imunoistoquímicas para receptores de estrógeno (RE), HER-2, p63 e CK5, a fim de classificar os tumores de acordo com sua expressão, nos diferentes subtipos. Além disso, foram utilizados os marcadores para CD10, BMI-1, CD44, CD24, ESA e MUC-1 por meio da imunoistoquímica em lâminas confeccionadas pela técnica de *Tissue microarray* (TMA) para avaliar a presença de células-tronco tumorais. A partir dos resultados da imunoistoquímica os tumores foram classificados em Luminal A (RE+ e HER-2-) (25,89%), Luminal B (RE+ e HER-2+) (33,93%), Superexpressão de HER-2 (RE- e HER-2 +) (14,29%) e Basal (RE-, HER-2- e p63 e/ou CK5 +) (25,89%). Dos 112 tumores, 75 foram positivos para CD10 (66,96%), 81 positivos para BMI-1 (72,32%), para o CD44 apenas seis tumores (5,35%) foram positivos, 48 tumores positivos para CD24 (42,86%), 24 positivos para ESA (21,43%) e 23 tumores foram positivos para MUC-1 (20,54%). Desses tumores, quatro apresentaram o imunofenótipo CD44+CD24-, representando 3,57% dos tumores. Ao correlacionar as marcações para células-tronco tumorais com os diferentes subtipos, alguns marcadores apresentaram diferença estatística, sugerindo que os tumores com imunofenótipo mais agressivo (Superexpressão de HER-2 e Basal) foram positivos para a marcação de células-tronco tumorais. Além disso, houve uma maior marcação das células-tronco tumorais para os carcinomas classificados em complexo, o que desafia os dados de literatura, já que esses tumores eram considerados com melhor prognóstico do que os carcinomas simples. São necessários novos estudos com novas amostras para confrontar com os dados desta pesquisa e determinar os marcadores mais indicados. Ainda assim, a cadela deve ser considerada para ser utilizada como modelo experimental para testar novos tratamentos, inclusive com alvos terapêuticos, pois compartilha os mesmos marcadores com o câncer de mama na mulher, ainda que em diferentes proporções.

Palavras-chave: Cadelas; Câncer de mama; Marcadores; Subtipos de tumores de mama; *Tissue microarray*.

Abstract

FIGUEIROA, F.C. Expression of stem cells in spontaneous mammary carcinoma in bitches and their correlation with aggressiveness degrees in different tumor subtypes. Botucatu, 2012. 104p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

For being the biggest cause of death among the canine females, mammary cancer arises the interest of the scientific community; therefore its presentation and clinical outcome are very similar to the cases of breast cancer in woman. In intention to allow the following of comparative studies between the tumors of dogs and women, immunohistochemical markers were performed to estrogen receptors (RE), HER-2, p63 e CK5, to classify the tumors according to their expression, in different subtypes. Beyond that, markers to CD10, BMI-1, CD44, CD24, ESA e MUC-1 were used through the immunohistochemical in slides made by Tissue microarray technique (TMA) to evaluate the presence of cancer stem cells. From the immunohistochemical results, tumors were classified in Luminal A (RE+ e HER-2-) (25,89%), Luminal B (RE+ e HER-2+) (33,93%), HER-2 Overexpression (RE- e HER-2 +) (14,29%) and Basal (RE-, HER-2- e p63 e/ou CK5 +) (25,89%). Among 112 tumors, 75 were positive to CD10 (66,96%), 81 positive to BMI-1 (72,32), to CD44 only six tumors (5,35%) were positive, 48 positive tumors to CD24 (42,86%), 24 positive to ESA (21,43%) and 23 tumors were positive to MUC-1 (20,54%). In these tumors, four presents CD44+CD24- immunophenotypes, performing 3,57% of tumors. To correlate cancer stem cells markers with the distinct subtypes, some markers presented statistical differences, suggesting that more aggressive tumors immunophenotypes (HER-2 Overexpression and Basal) were positive to cancer stem cells markers. Besides, there were higher cancer stem cell markers in complex carcinomas, which challenge literature data because this kind of tumor was considered with better prognosis when compared with simple carcinomas. More studies are necessary with new samples to confront this research results' and determinate the more indicated markers. Still, the female dog must be considered to be used as experimental model for breast cancer to test new treatment, including therapeutic targets, because they share the same markers as breast cancer in women, even in different proportions.

KEY WORDS: Female dogs; Mammary tumor; Markers; Mammary tumors subtypes; *Tissue microarray*.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum na cadela e na mulher (MISDORP, 2002; PELED *et al.*, 2008). Os tumores de mama em cadelas despertam interesse especial para oncologistas médicos e veterinários devido à similaridade que apresentam com o câncer de mama na mulher (NERURKAR *et al.*, 1989; HATAKA, 2004). Várias características epidemiológicas, clínicas e biológicas são semelhantes aos da espécie humana e por isso vêm sendo utilizados como modelos para o conhecimento de alguns aspectos da carcinogênese mamária (CASSALI, 2000).

Assim como o câncer de mama na mulher, os tumores mamários nas cadelas representam um grupo heterogêneo de tumores com diversidade no comportamento biológico, evolução e resposta à terapia (MATOS *et al.*, 2005). Recente estudo do perfil de microarranjo de cDNA em tumores mamário humanos tem identificado distintos subtipos de carcinomas que são associados com diferentes evoluções clínicas (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). Os marcadores moleculares são úteis na caracterização de células neoplásicas nem sempre vistas na histopatologia, dando ao clínico uma nova perspectiva no tratamento. Eles podem evidenciar tanto fatores de proliferação celular quanto de apoptose celular.

Na literatura recente há um aumento no número de investigações sobre marcadores prognósticos no câncer de mama de cadelas (ZAIDAN DAGLI, 2008), incluindo os marcadores de proliferação (MATOS *et al.*, 2006), receptores hormonais (DE LAS MULAS *et al.*, 2005), p53 e receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) (DE LAS MULAS *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004), entre outros. Com eventos celulares distintos envolvidos no processo de crescimento celular, diferenciação, proliferação, invasão e metástases (BECKMANN *et al.*, 1997), a investigação de alterações moleculares múltiplas assumem um papel importante na pesquisa desses tumores.

A mama é composta por células que estabelecem entre si uma rede de interações responsável pelo desenvolvimento e função do órgão. Durante o desenvolvimento, passa por uma série de transformações e alterações que

determinam mudanças na morfologia e na expressão de proteínas. A maioria delas pode ser identificada pela imunoistoquímica. Sendo assim, pode-se avaliar a expressão de cada uma delas nas diferentes etapas do desenvolvimento mamário. As interações entre os tipos celulares e estas proteínas mantêm um microambiente responsável pela regulação das atividades celulares como, por exemplo: proliferação, sobrevivência, polaridade, diferenciação e capacidade de invasão. Um desequilíbrio nesse microambiente pode resultar no aparecimento de anomalias no desenvolvimento da glândula, predispondo a doenças inflamatórias, alterações fibrocísticas, neoplasias malignas, dentre outros (GUSTERSON *et al.*, 2005).

Todos os tecidos no organismo adulto são derivados de células-tronco com propriedades específicas que mantêm a integridade do tecido. Estas células-tronco são conhecidas principalmente por sua capacidade de se auto-renovarem e se diferenciarem em outros tipos celulares que compõe o órgão em que se encontram (OLIVEIRA *et al.*, 2010). A teoria mais aceita sobre a etiopatogênese do câncer é que ele se origina de uma única célula que adquire a capacidade de se proliferar indefinidamente. Essas células compartilham características com as células-tronco do tecido adulto normal, por isso são denominadas células-tronco tumorais (CARIATI & PURUSHOTHAM, 2008).

Acredita-se que as neoplasias malignas são resultados de mutações sequenciais que podem ocorrer como consequência de uma progressiva instabilidade genética e/ ou fatores ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Com a expansão clonal, a maioria dessas células se diferencia para outros tipos celulares e perdem as características de células-tronco. Entretanto, parte delas permanece em seu estado original, e acredita-se que sejam essas células que mantêm o crescimento tumoral e que determinam a resistência a diversos esquemas terapêuticos (PHILLIPS *et al.*, 2006). Um dos grandes desafios da oncologia atual é identificar e estudar as características das células-tronco tumorais (PONTI *et al.*, 2005).

Crescentes estudos mostram que as células-tronco neoplásicas são as responsáveis pelo insucesso dos tratamentos e consequente recidiva (GUPTA *et al.*, 2009). São vários os imunomarcadores utilizados para essa avaliação e podem variar no tipo e local de marcação. Eles evidenciam moléculas de

adesão, metaloproteinases, antígenos epiteliais e sítios de ligação celular específicos.

Espera-se encontrar a imunomarcagem das células-tronco tumorais nos carcinomas de mama de cadelas que apresentam maior agressividade considerando os aspectos: clínico (carcinoma inflamatório), diagnóstico histopatológico (carcinoma simples) e subtipo (carcinoma que superexpresse HER-2 e carcinoma basal).

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama espontâneo é a neoplasia mais prevalente na cadela e na mulher (CAMERON e FOSTER, 2009; KLOPFLEISCH *et al.*, 2010). Embora, em ambas as espécies, a ocorrência varie com a idade, geografia e raça ou etnia, a incidência desse câncer é, em geral, de uma em quatro cadelas, não esterilizadas, com idade superior a quatro anos (FANTON e WITHROW, 1981; Mac EWEN e WITHROW, 1996) e uma em nove mulheres com idade entre 50 e 69 anos (CANADIAN, 2009; AUSTRALIAN, 2010). No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de mama em 2011 foi de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama foi o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos para cada 100 mil (BRASIL, 2012).

A maioria dos tumores de mama afeta cadelas com idades compreendidas entre os oito e os 10 anos, no entanto, podem surgir tumores malignos em cadelas com menos de cinco anos (BURINI, 2002). Não existe predisposição racial evidente, embora no Brasil ocorram mais frequentemente em cadelas sem raça definida (SRD), isso se deve ao fato de haver o predomínio de cães mestiços no país (FERREIRA & CASSALI, 2003). O tamanho dos tumores pode variar, desde pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro até tumores com mais de 15 cm no seu maior diâmetro. Em alguns animais o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação. Apesar da sua alta taxa de ocorrência estas neoplasias apresentam um desafio terapêutico para o clínico, pois exibem variações consideráveis na sua aparência clínica e histológica (LOAR, 1992).

Os exames microscópicos convencionais para o diagnóstico e prognóstico desse câncer são o citopatológico e o histopatológico (ALLEN *et*

al., 1986; ARAUJO *et al.*, 1999; GRANDI *et al.*, 2010). O diagnóstico microscópico considera o padrão tecidual classificado como ductal, papilar, tubular e sólido e suas características citológicas. O diagnóstico e a classificação dos diferentes tipos de neoplasia são importantes para indicar o seu comportamento biológico (PEREZ-MARTINZ *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 2006; GRANDI *et al.*, 2010).

Para Misdorp (2002) o exame histopatológico é o melhor método de diagnóstico dos tumores de mama em cadelas, pois inclui o tipo de tumor e fornece informações acerca do prognóstico. A análise das células tumorais auxilia muito para a determinação do comportamento biológico do tumor (PHILIBERT *et al.*, 2003). Assim como o câncer de mama na mulher, os tumores mamários nas cadelas representam um grupo heterogêneo de tumores com diversidade no comportamento biológico, evolução e resposta à terapia (MATOS *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde realizou a classificação de tumores mamários de cães e gatos, associando histogênese, descrição da expressão morfológica e fatores prognósticos (MISDORP *et al.*, 1999).

2.2 Subtipos tumorais

Estudos do perfil da expressão gênica em tumores de mama humanos identificaram distintos subtipos moleculares de carcinomas da mama, os quais diferem em sua patobiologia e evolução clínica (PEROU *et al.* 2000; SORLIE *et al.* 2001; SORLIE *et al.* 2003). Sorlie *et al.* (2003) analisaram o perfil de expressão de 115 amostras de tumores de mama esporádicos humanos e os categorizaram em cinco grupos principais: Luminal A, Luminal B, Super-expressão de HER-2, Basal e tecido mamário normal. Os subtipos, Luminal A e B baseiam-se na expressão de receptores de estrógeno, enquanto o subtipo Basal é caracterizado pela ausência de receptores hormonais e presença de

expressão de marcadores de células basais (BIRNBAU *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004).

A presença de receptores hormonais específicos nos tumores mamários de cadelas foi demonstrada em alguns estudos (GERALDES *et al.*, 2000; de LAS MULAS *et al.*, 2004). Trabalhos utilizando técnicas de radioimunoensaio constataram que cerca de 40 a 60% das neoplasias malignas de mama na mulher possuem receptores para estrógeno (RE) ou progesterona (RP) (PINOTTI, 1991). Mulheres com tumor de mama que expresse receptores de estrógeno têm um elevado índice de sobrevida e uma melhor resposta a tratamentos hormonais (COCKER *et al.*, 1969; PICHON *et al.*, 1980; DUNNWALD *et al.*, 2007). Nas cadelas, a expressão de RE é maior em tumores benignos do que em malignos, além de ser maior em tumores complexos e mistos do que quando comparado aos subtipos simples (de LAS MULAS *et al.*, 2004).

O proto-oncogene c-erbB-2 codifica uma glicoproteína transmembranar (HER-2) com atividade de tirosina quinase, a qual pertence à família dos receptores de fator de crescimento epidérmico humano (BARGMAN *et al.*, 1986). Desde o seu relato inicial por Slamon *et al.* 1987, foi demonstrado uma associação entre a amplificação desse gene e um prognóstico pobre no câncer de mama na mulher, especialmente casos com metástase para linfonodo e/ou doença metastática ou recorrente. Alguns estudos apontam que superexpressão é detectada em 10 a 20 % dos carcinomas mamários invasivos da mulher (TSUDA, 2006; ELLSWORTH, 2008).

A p63, caracterizada como um homólogo da p53 (YANG *et al.*, 1998), é necessária para a manutenção das células de reserva da população epitelial, e é expressa nas células basais de muitos tipos de epitélio estratificado (KAELIN *et al.*, 1999; LITTLE *et al.*, 2002; PELLEGRINI *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2000), e nas células mioepiteliais da mama humana (BARBARESCHI *et al.*, 2001), sendo considerada um possível marcador para as células de reserva (SIGNORETTI *et al.*, 2000; RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2003). A inativação da p63 na linha germinativa sugere que esta proteína é necessária para o desenvolvimento de certos tecidos, como a glândula mamária (de LAURENZI *et al.*, 2000; MILLS *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1999). Em tumores mamários

malignos, a imunoexpressão da p63 revela um fenótipo mioepitelial nem sempre identificado pela histopatologia rotineira assim como em relatos prévios usando diferentes marcadores mioepiteliais (DESTEXHE *et al.* e GRIFFEY *et al.*, 1993). A p63 também é expressa em tumores de mama com diferenciação escamosa (RAMALHO *et al.*, 2006) e em carcinomas escamosos (epidermóides) em diferentes localizações anatômicas. Borba (2008) concluiu que a p63 se mostrou altamente expressa nos carcinomas epidermóides da laringe, mas que a sua hipoexpressão foi preditiva de um pior prognóstico dos pacientes. O p63 encontra-se superexpresso no carcinoma epidermóide do esôfago, mas não nos adenocarcinomas colorretal e esofágico, sugerindo que o p63 possa contribuir para a carcinogênese dos tumores escamosos (GLICKMAN *et al.*, 2001). Além disso, verificou-se correlação entre expressão do p63 e mutação no p53 em neoplasias avançadas e displasias de alto grau esofágicas (HALL *et al.*, 2001).

As células mioepiteliais expressam citoqueratinas (CK) específicas de células basais, como a CK5 (constituintes do citoesqueleto das células) e sua localização é nas camadas basal e parabasal da mama (PEROU *et al.*, 2000). Estas células foram interpretadas no começo como sendo apenas células mioepiteliais, mais tarde foi proposto que elas podem representar células progenitoras na mama da mulher (BÖCKER *et al.*, 1993). Mais recentemente foi evidenciado que elas têm a propriedade de se diferenciar em células glandulares e mioepiteliais (BÖCKER *et al.*, 2002a). A positividade para CK5 em carcinomas mamários na mulher correlaciona-se com indicadores de mau prognóstico, incluindo idade precoce, alto grau histológico, linfonodos positivos, estágio patológico avançado e negatividade para receptores hormonais (VALE, 2006).

Gama *et al.* (2008), Figueiroa (2009) e Sassi *et al.* (2010) reclassificaram os carcinomas espontâneos de mama em cadelas em quatro categorias: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal, a partir da marcação imunoistoquímica para RE, HER-2, p63 e CK5.

2.3 Tissue microarray (TMA)

Com a finalidade de identificar as alterações genéticas da carcinogênese pode-se caracterizar as expressões de proteínas por meio de marcação imunoistoquímica e análises de DNA e RNA. Desse modo, a utilização da técnica de *Tissue microarray* (TMA) permite analisar tecidos com técnicas *in situ*, como a imunoistoquímica (IHC), a hibridização do RNA *in situ* e a hibridização fluorescente *in situ* (BUBENDORF, 2001a). Esta técnica foi descrita pela primeira vez por Kononen *et al.* em 1998 e consiste em realocar tecidos incluídos em parafina de histologia convencional de tal maneira que dezenas a centenas de tecidos possam ser colocados em um bloco receptor e assim serem examinados e comparados numa mesma lâmina histológica. Em vista disso, um número maior de amostras pode ser analisado ao mesmo tempo, tornando os estudos mais eficientes e evitando desperdício de materiais e reagentes, portanto é economicamente vantajoso, além de proporcionar um melhor entendimento molecular dos tumores e identificar novos marcadores prognósticos ou alvos terapêuticos (BUBENDORF, 2001b). Além disso, a técnica de imunoistoquímica feita em lâminas confeccionadas pelo TMA evita a possível variação entre as reações, permitindo que as amostras sejam marcadas de maneira uniforme.

2.4 Células-tronco

Pereira *et.al.* (2005) relatam que as células-tronco se destacam por serem células especiais, possuidoras de uma característica peculiar. Esta se baseia no fato de poderem se diferenciar e constituir diferentes tecidos no organismo, atuando como células que têm a função de auxiliar no reparo de uma lesão. Pode-se citar, por exemplo, as células-tronco da medula óssea que têm função de regenerar o sangue, visto que células sanguíneas se renovam incessantemente. São células pouco ou não diferenciadas, com grande

capacidade de transformação celular. Podem ser encontradas em embriões, cordão umbilical e tecidos adultos como o sangue, a medula óssea e o fígado, por exemplo.

As células-tronco são classificadas, para efeito de estudo e terapia celular, em embrionárias e adultas. As embrionárias são extraídas de embriões gerados pelo processo de fertilização *in vitro*. Estas células têm o potencial de formar todas as mais de duzentos tipos de células do corpo. Elas podem ser obtidas de embriões humanos excedentes que são descartados em clínicas de fertilização e pela técnica de clonagem terapêutica (PEREIRA *et.al.*, 2005).

O organismo possui pequena quantidade de células-tronco em vários tecidos e órgãos, onde ficam latentes até serem ativadas por uma enfermidade ou um ferimento; estas são as adultas. Ao contrário das embrionárias elas não são aptas a se transformar em todos os tipos de células e provavelmente desenvolvam-se apenas nos mesmos tipos de células dos tecidos de origem. As células-tronco adultas foram descritas no cérebro, córnea, retina, coração, tecido adiposo, pele, polpa dentária, medula óssea, músculos esqueléticos, intestinos, vasos sanguíneos, mamas e no sangue (PEREIRA *et.al.*, 2005).

As células-tronco são classificadas em:

- totipotentes: aquelas que, isoladas, são capazes de gerar todos os tecidos de um indivíduo, incluindo os tecidos placentários.
- pluripotentes: capazes de diferenciar-se em todos os tecidos do corpo humano, exceto nos tecidos placentários.
- oligopotentes: também chamadas de células-tronco adultas, são portadoras de um potencial de diferenciação mais restrito, limitado a apenas alguns tipos celulares, são encontradas em estágios posteriores do desenvolvimento fetal e persistem após o nascimento.
- unipotentes: capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela regeneração de tecidos particulares, por exemplo: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, células do fundo das criptas de Liberkham no duodeno, espermatogônias no testículo etc.

As totipotentes e pluripotentes só são encontradas nos embriões. As oligopotentes ainda são objetos de pesquisa, porém já foi comprovado que são encontradas no trato intestinal e tecido hematopoiético. E as unipotentes estão

presentes, por exemplo, no tecido cerebral adulto, na próstata e na mama (PEREIRA *et.al.*, 2005), sendo estas de interesse em estudos de células-tronco tumoral.

2.5 Células-tronco tumorais

A hipótese de o câncer ser originado de células-tronco considera que as células de reserva que possuem a capacidade de auto-renovação tendem a acumular alterações genéticas ao longo do tempo, evadindo-se dos mecanismos de controle do microambiente e, com isso, dão suporte à evolução tumoral (SHIPITSIN & POLYAK, 2008) (Figura 1). A semelhança entre as células-tronco e as cancerosas tem sido observada há muito tempo. O primeiro registro relativo a essa hipótese foi proposto há quase 150 anos por Durante (1874) (WICHA *et al.*, 2006). Os estudos foram retomados 82 anos mais tarde e pesquisadores confirmaram a hipótese de células-tronco tumorais mostrando que uma célula tumoral poderia gerar células descendentes e proporcionar o crescimento de um novo tumor (MAKINO, 1956; BRUCE & VAN DER GAAG, 1963, KLEINSMITH & PIERCE, 1964).

Hamburger & Salmon (1977) corroboraram a hipótese de que alguns cânceres podem conter pequena subpopulação de células similares às células-tronco normais, uma vez que, em bioensaios, houve crescimento de lesões malignas com proliferação indefinida de população celular que sugeria ser células-tronco tumorais.

Em modelos animais, a habilidade de uma pequena população celular originar neoplasia maligna foi demonstrada num experimento clássico que consistiu em transplantar células de leucemia mieloide aguda humana que expressavam marcadores de superfície associados a células-tronco hematopoiéticas normais. Lapidot *et al.* (1994) mostraram que o transplante de células-tronco tumorais podiam iniciar leucemia em camundongo diabético, não obeso e com severa imunodeficiência, enquanto que as células tumorais isoladas não podiam. Com isso, esse ensaio tornou-se o método padrão para

determinar se populações celulares isoladas de um tumor sólido são células-tronco tumorais.

Desde então, células-tronco tumorais tem sido isoladas de muitos outros tumores incluindo cérebro, mama, cólon, pâncreas, próstata, pulmão e câncer de cabeça e pescoço (COLLINS *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005; DALERBA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007; PRINCE *et al.*, 2007).

A principal característica de células-tronco tumorais é sua propriedade de auto-renovação, sua habilidade de gerar tumores a partir de pouquíssimas células, sua divisão celular lenta, sua habilidade de produzir uma progênie distinta fenotipicamente e sua resistência seletiva a radioterapia e quimioterapia (REYA *et al.*, 2001). As características de auto-renovação e diferenciação levam à produção de todos os tipos celulares de um tumor, gerando a heterogeneidade tumoral (CAMPBELL & POLYAK, 2007).

Em vários tecidos foi proposto que algumas células progenitoras comprometidas podem se tornar células-tronco tumorais através de um processo de desdiferenciação celular, o qual ocorre pela aquisição de propriedades das células-tronco (PONTI *et al.*, 2005; KRIVTSOV *et al.*, 2006; COBALEDA *et al.*, 2007).

Além da capacidade de auto-renovação, existem outras características que incluem: produção de células desdiferenciadas, ativação de vias anti-apoptóticas (resistência à apoptose), indução da angiogênese e resistência a drogas (pela expressão da telomerase ativa e elevada atividade do transporte membranar), e a habilidade de migrar e se espalhar pelo organismo causando metástases (WICHA *et al.*, 2006).

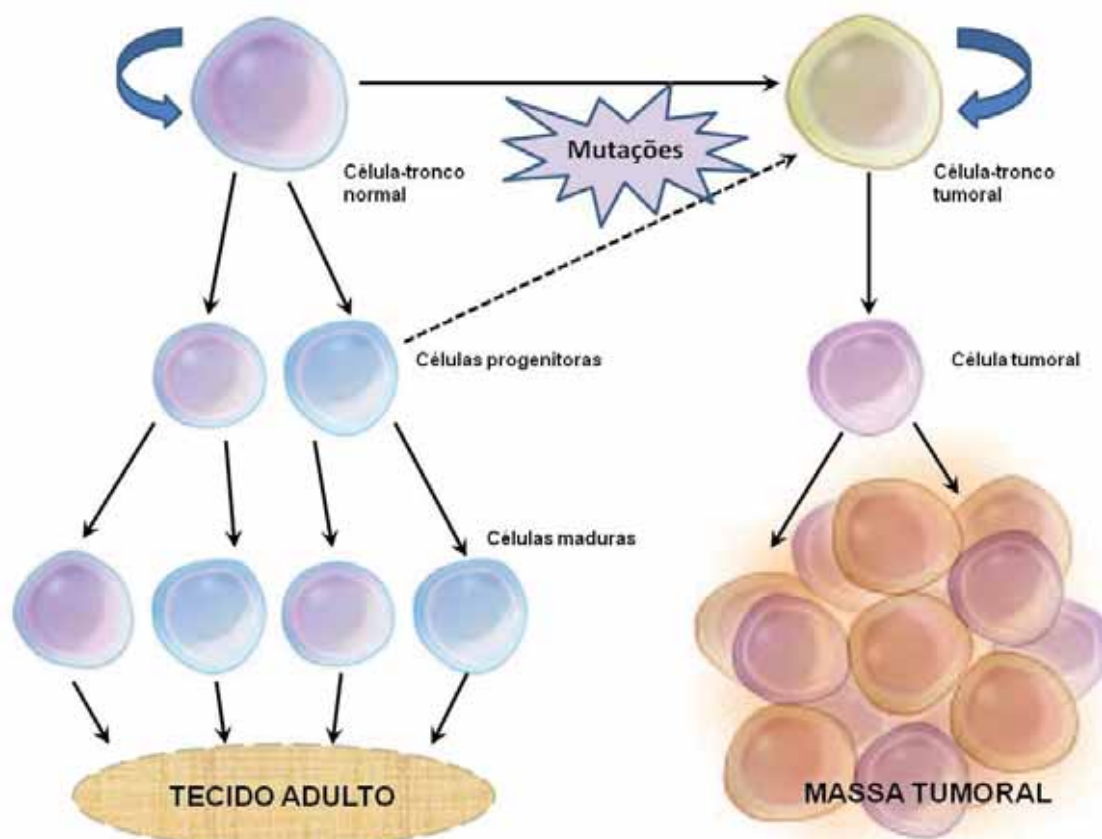


Figura 1. Sistemas de células-tronco: Tecido normal descende de uma célula-tronco central que cresce e se diferencia para criar células progenitoras e células maduras. As características chave das células-tronco normais são a habilidade de auto-renovação (indicada pela seta curva), potencial de multi-diferenciação (indicada pelas células de diferentes cores) e sua capacidade proliferativa extensa. As células-tronco tumorais surgem a partir de mutações nas células-tronco normais ou nas progenitoras, que crescem e se diferenciam para produzir o tumor primário. Assim como as células-tronco normais, as Células-tronco tumorais podem se auto-renovar, dar origem a uma população heterogênea de células filhas e se proliferar incessantemente (Modificado de Jordan *et.al.*, 2006).

2.6 Células-tronco tumorais em câncer de mama

O câncer de mama é uma doença complexa, sendo a principal causa de morte na mulher e também na cadela. Apesar do tratamento em associação com cirurgia, radioterapia e medicamentos anti-câncer, muitas pacientes portadoras de câncer de mama tem desenvolvido doença metastática, incurável até o momento. Enquanto muitos estudos tem tentado demonstrar a presença de células-tronco tumorais na mama, baseados no perfil de marcação

de superfície celular, ainda falta consenso na caracterização fenotípica dessas células (LORICO, 2010).

Encontrar as células-tronco tumorais da mama é um importante objetivo de muitos pesquisadores, que estão tentando definir um marcador universal ou uma combinação de marcadores capaz de identificar especificamente estas células no tumor de mama e, finalmente, as isolar. Revendo a literatura, a maioria dos estudos em Células-tronco tumorais mamárias são nas proteínas transmembrânicas CD44 e CD24. Uma subpopulação de células tumorais que expressam fortemente o CD44 mas não o CD24 (fenótipo CD44+CD24-/baixo) foi identificada como Células-tronco tumorais por Al-Hajj *et al.* (2003) e subsequentemente confirmada por outros autores.

O CD44 é uma glicoproteína transmembrânica, que apresenta várias isoformas, e normalmente regulam a adesão célula-célula e interação célula-matriz, assim como a migração celular. Essa glicoproteína se liga principalmente ao ácido hialurônico, assim como ao colágeno, fibronectina, laminina e sulfato de condroitina – todos componentes importantes da matriz extracelular. Também se liga a citocina osteopontina (ORIAN-ROUSSEAU, 2010). Membros da família do CD44 diferem em seu domínio extracelular pela inserção de regiões variadas através de *splicing* alternativo (PONTA *et al.*, 2003). Em contraste à forma padrão do CD44, a qual é geralmente expressa em todas as células epiteliais e linfócitos, as formas variantes do CD44 exibem uma expressão tecido-específica. Algumas dessas variantes, em particular a variante CD44v6, estão associadas a tumores com comportamento mais agressivo e sua expressão se correlaciona a um pior prognóstico em vários tumores humanos, incluindo câncer de mama (AFIFY *et al.*, 2009).

O CD24 é uma proteína mucinosa glicosilada pesada, pequena, a qual é ligada à membrana celular via âncora de GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Esta molécula está envolvida na regulação da proliferação celular e na interação célula-célula, também foi demonstrado que ela é expressa em pré-linfócitos B normais (perdendo essa expressão durante a maturação em plasmócitos), assim como em vários cânceres hematológicos e em tumores sólidos de determinados órgãos (LIM, 2005). CD24 é o ligante da P-seletina e também é expressa em receptores de adesão de células endoteliais ativadas e em

plaquetas, e isto sugere que essa proteína pode ter um papel importante no processo de metástase (AIGNER et al, 1998 e KIM et al, 2007).

Usando a combinação desses dois marcadores de superfície celular, Al-Hajj et al. (2003) foram os primeiros a distinguir células cancerosas tumorigênicas.

A MUC1 é um membro da família das mucinas, que são proteínas de membrana glicosiladas. A mucina 1 é uma proteína heterodimérica transmembrana com uma subunidade citoplasmática C terminal (MUC1-C) (HUANG et al., 2010; MACDERMED et al., 2010) que é responsável pela interação com receptores de fatores de crescimento e efetores como β -catenina, I κ B quinase e p53 que regulam o ciclo, o crescimento e a morte celular (HUANG et al., 2010). A superexpressão, a localização intracelular aberrante e alterações na glicosilação da MUC1 estão associadas ao desenvolvimento do carcinoma de mama (YANG et al., 2010), pois há perda de polaridade celular levando à perda da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (ABBA et al., 2006). Além disso, a MUC1 está diretamente relacionada com diversas vias de sinalização celular como a via da AKT (phosphoinositol-3 kinase), podendo ativar esta como parte de respostas anti-apoptóticas (HATTRUP & GENDLER, 2006). Como a MUC1 encontra-se superexpressa em cerca de 90% dos carcinomas mamários, a imunoterapia específica contra essa proteína é uma opção terapêutica promissora no tratamento deste tipo de câncer, no entanto essa superexpressão também confere resistência à morte celular induzida pelo estresse quando expostas a agentes anticancerígenos genotóxicos (HATTRUP & GENDLER, 2006; MACDERMED et al., 2010).

O CD10, também conhecido como Neprilysin e CALLA (do inglês "*common acute lymphoblastic leukemia antigen*") é uma metaloproteinase zinco dependente (glicoproteína de superfície) de 90 a 110 kd e é localizado no cromossomo 3 na região q21- 27 que quebra ligações peptídicas no lado hidrofóbico de aminoácidos (PAPANDREOU & NANUS, 2010). Degrada, entre outros, o peptídeo beta amilóide, cuja deposição no sistema nervoso central é considerada uma das causas da doença de Alzheimer (HERSH & RODGERS, 2008). CD10 foi identificado em diversos tipos celulares normais como células

mioepiteliais da mama (que expressa CD10 na membrana lateral) (MORITANI *et al.*, 2002; WAGONER *et al.*, 2007), glândulas salivares, células ductais prostáticas, células glomerulares do rim, células estromais do endométrio dentre vários outros tecidos (TSE *et al.*, 2005). Essa metaloproteinase foi identificada também em células metaplásicas apócrinas e adenocarcinoma *in situ* (MORITANI *et al.*, 2002), células de mama neoplásicas, carcinomas, gliomas, melanomas, dentre outros (TSE *et al.*, 2005).

Em alguns tipos de câncer, como no carcinoma metastático da mama e no melanoma, existe Superexpressão de CD10, enquanto que em outros cânceres, como o carcinoma de pulmão, sua expressão está reduzida (KRISTIANSEN *et al.*, 2002; SMOLLICH *et al.*, 2007). Dentre os substratos do CD10 há uma gama de pequenos peptídeos, como bombesina, fator natriurético atrial (WAGONER *et al.*, 2007) endotelina-1 e fator de crescimento do fibroblasto (PAPANDREOU & NANUS, 2010). Sendo assim, células que perdem a metilação do CD10 permitem que ocorra um aumento da migração, crescimento e sobrevivência celular contribuindo para o desenvolvimento e progressão neoplásica (PAPANDREOU & NANUS, 2010). Segundo Wagoner *et al.* (2007) o CD10 geralmente reduz a resposta celular a peptídeos hormonais e a quantidade de CD10 expresso parece se relacionar com a taxa de crescimento celular e em células de neoplasias malignas ocorre um aumento do índice proliferativo (WAGONER *et al.*, 2007).

O ESA (do inglês “epithelial specific antigen”) tem sido considerado um marcador de células-tronco tumorais de diversas neoplasias, incluindo os carcinomas de mama, próstata e pâncreas (LI *et al.*, 2007). No câncer de mama o ESA é um marcador de células-tronco em tumores RE positivos, e, além disso, pode estar associado com metástase linfonodal e recorrência tumoral (LIU *et al.*, 2009). Essa proteína pode ser encontrada tanto em células mioepiteliais quanto em células luminais e células que expressam ESA+ podem indicar que estas são células-tronco ou progenitoras na mama (CLAYTON *et al.*, 2004). Há alguns estudos que mostram evidências de células progenitoras epiteliais mamárias bi-potentes em tecido mamário adulto normal que apresentam ESA e MUC1 e quando reproduzidos *in vitro* originam clones que expressam somente marcadores luminais (CARIATI & PURUSHOTHAM,

2008). Células que expressam ESA+/ MUC1-/fraco/ CD10+/ fraco podem gerar clones de ambas as linhagens (STINGL *et al.*, 1998). O epitélio mamário é composto fundamentalmente de dois tipos celulares: epitélio basal (mioepitelial) e epitélio luminal (A e B). Cada tipo celular é capaz de apresentar fenótipo de carcinoma invasivo com características histológicas diferentes e também expressar receptores diferentes (GUSTERSON *et al.*, 2005).

Segundo Clayton *et al.* (2004) em cultura de células mamárias, as células luminais gradativamente se convertem em células mioepiteliais mostrando que estas últimas são derivadas de precursores luminais (CLAYTON *et al.*, 2004). No tecido mamário, a combinação dos imunofenótipos com MUC1, CD10 e ESA, por exemplo, podem levar a diferenciações celulares diferentes como: células progenitoras MUC1+/CD10-/ESA+ se diferenciam para células luminais, células progenitoras MUC1-/CD10+/ESA- se diferenciam para células mioepiteliais e células progenitoras MUC1-/CD10+/ESA+ se diferenciam para ambas as linhagens (STINGL *et al.*, 1998). Porém, a relação destes imunofenótipos com prognóstico e terapêutica ainda não está bem estabelecido.

O BMI-1 é uma proteína codificada pelo gene BMI-1 (do inglês “B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1 gene”), a primeira a ser relatada da família das proteínas *polycomb* (gene PcG), desempenha um papel importante nos processos biológicos, como a diferenciação e estabilização de células-tronco, formação dos órgãos, desenvolvimento embrionário (VAN DER LUGT *et al.*, 1994) e participa da carcinogênese de vários tumores, incluindo câncer pancreático, câncer de mama e carcinoma gástrico (KIM *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008; DHAWAN *et al.*, 2009). Estudos tem demonstrado que a BMI-1 reprime o loco INK4a. Este loco é responsável por codificar as proteínas p16 e p19, as quais são aptas a induzir o crescimento controlado, a senescência celular e apoptose, destacando um papel central da BMI-1 na atividade de auto-renovação celular (KAMIJO *et al.*, 1997; JACOBS *et al.*, 1999). A instabilidade genética é a marca do cancer, responsável pelas mutações que podem dar origem a células aberrantes com fenótipos mais agressivos. Sob condições normais, as células não são capazes de iniciar apoptose por quebras de fita simples e fita dupla. Recentemente, Ginjala *et al.* (2011)

demonstraram que a BMI-1 é recrutada pelos sítios de quebra do DNA e ainda participa na indução de danos de ubiquitinação da H2AX (histona), implicando a BMI-1 na resposta do DNA ao dano (GINJALA *et al.*, 2011).

2.7 Alvos terapêuticos contra células-tronco tumorais

O desenvolvimento de tratamentos que alcancem as células-tronco tumorais é um importante objetivo, mas os desafios são enormes. Primeiro deve-se procurar um tratamento que erradique seletivamente as células-tronco tumorais. Este passo requer o desenvolvimento de ensaios para caracterizar as funções das células-tronco normais e os meios para definir as características físicas (marcadores de superfície celular, por exemplo) que permitam o seu isolamento. Sem este conhecimento é impossível saber se a droga candidata é também citotóxica às células-tronco normais. Em segundo lugar, é preciso caminhos similares para descrever as células-tronco tumorais e ensaios funcionais apropriados devem ser validados. Por último, é crítico o entendimento de como as células-tronco tumorais diferem das normais, particularmente em relação ao controle de sobrevivência celular e resposta a injúrias. O ideal seria a terapia almejar unicamente as vias pelas quais as células-tronco tumorais resistem a lesões extrínsecas ou para manter a viabilidade em estados estacionários (JORDAN *et al.*, 2006).

É preciso entender como as terapias conhecidas cujo alvo seja a massa tumoral falham em erradicar as células-tronco tumorais (Figura 2). A razão para este fenômeno pode trazer importantes informações para o desenvolvimento de protocolos mais efetivos, tanto para as células-tronco tumorais como para a massa tumoral como um todo. Outro desafio em focar as células-tronco tumorais é entender como as propriedades dessas células fazem com que sua eliminação seja particularmente difícil (JORDAN *et al.*, 2006).

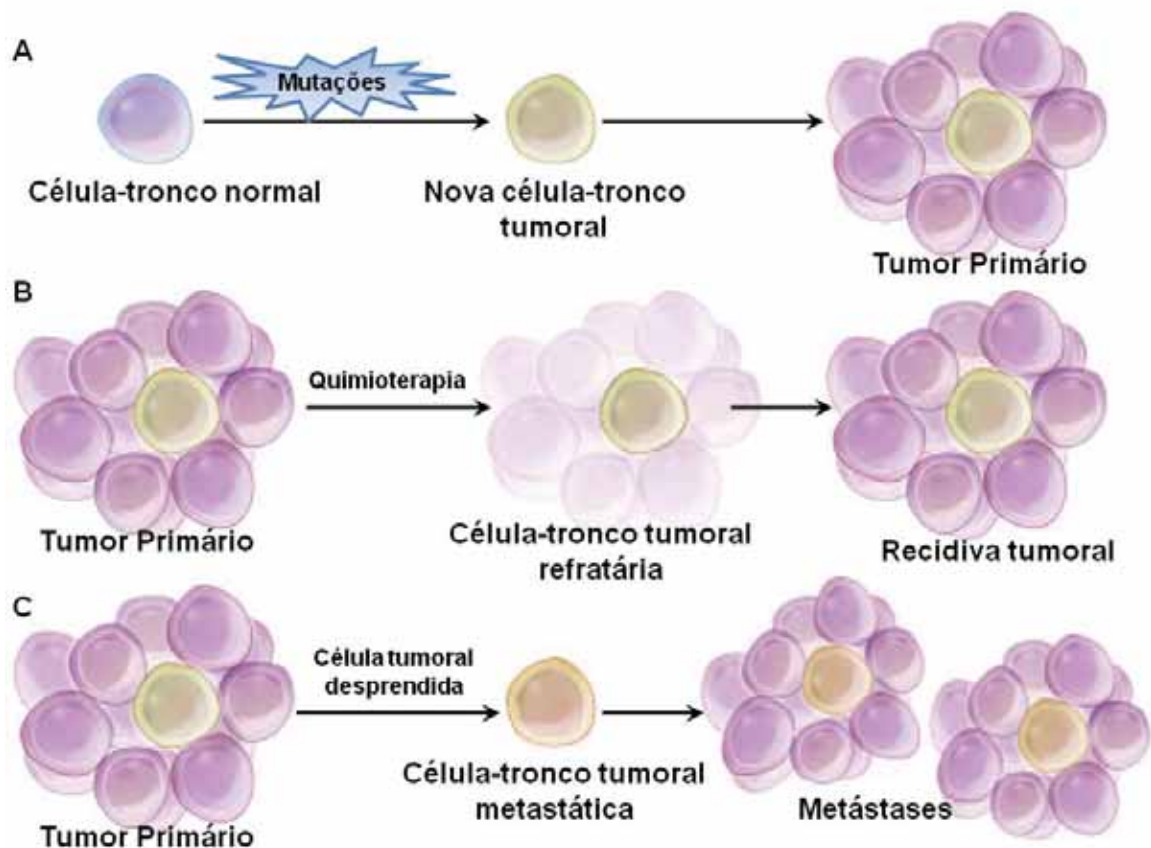


Figura 2. Cenários envolvendo células-tronco tumorais: A- Mutação de célula-tronco normal pode criar célula-tronco tumoral, a qual irá gerar um tumor primário. B- Tumor primário tratado com quimioterápicos pode ter maioria das células destruída, mas se alguma célula-tronco tumoral não for erradicada o tumor tornará a crescer causando recidiva local. C- Células-tronco tumorais decorrentes do tumor primário podem emigrar para sítios distantes e criar lesões metastáticas (Modificado de Jordan *et.al.*, 2006).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Analisar a expressão dos marcadores de células-tronco (CD44, CD24, CD10, MUC-1, BMI-1 e ESA) em carcinomas espontâneos de mama em cadelas por meio de imunoistoquímica realizada em lâminas confeccionadas pela técnica de *Tissue microarray* e correlacioná-las com os subtipos: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER-2 e Basal.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Regulamentação do estudo

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, campus de Botucatu, sob o protocolo nº 135/2009-CEUA (anexo I), e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal. A inclusão dos animais foi condicionada ao consentimento por escrito dos proprietários (anexo II).

4.2 Seleção das amostras

Os cães doadores das amostras foram atendidos no setor de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP – Botucatu e as amostras processadas no Serviço de Patologia da mesma Instituição. Foram utilizados blocos histológicos de 112 tumores de mama de cadelas e divididos em dois grupos de acordo com o diagnóstico histopatológico: carcinoma simples e carcinoma complexo.

4.3 Diagnóstico histopatológico

Após fixação em formalina a 10% tamponada por 48 horas e inclusão das amostras em parafina, foram obtidos cortes de 4µm de espessura e

utilizada coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da qualidade da lâmina, classificação da neoplasia e escolha dos locais para a coleta dos cilindros para o *Tissue Microarray*. A classificação da neoplasia foi feita segundo Misdorp *et al.*, (1999), de acordo com a composição celular. Quando a neoplasia era composta por um tipo celular (epitelial secretora) foi classificada em carcinoma simples; quando era composta por mais de um tipo celular (epitelial secretora e mioepitelial), em carcinoma complexo.

4.4 Construção do *Tissue microarray* (TMA)

Áreas representativas das neoplasias foram selecionadas a partir de cortes corados com HE e as áreas de interesse, marcadas nas lâminas e identificadas nos blocos doadores, foram retiradas e transferidas para os blocos receptores. Para cada caso foram retirados dois cilindros de 0,6mm de diâmetro de duas áreas distintas do tumor. Para os carcinomas complexos foi retirada amostra que continha os dois componentes do tumor (células epiteliais e mioepiteliais). Em cada bloco de TMA foram incluídas também amostras de placenta normal para orientação do bloco. A construção do TMA foi feita no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo / Fundação Antônio Prudente (São Paulo – SP) e foi utilizado o *Manual Tissue Arrayer I* (MTA-1), *Beecher Instruments, Silver Spring, USA*.

Após a construção, cortes de 3 µm foram efetuados e aderidos a lâminas histológicas carregadas positivamente (*Positive charged adhesion slides*, Amitel, Brasil), parafinizadas e armazenadas a -20°C até sua utilização nas reações imunoistoquímicas. Um corte do bloco receptor foi corado em HE e revisado para confirmar a presença de áreas morfológicas representativas das lesões originais.

4.5 Imunoistoquímica

Os anticorpos utilizados, respectivos fabricantes e diluições estão sumarizados na Tabela 1.

As amostras contidas nas lâminas de TMA foram submetidas à reação imunoistoquímica seguindo o protocolo padronizado no Laboratório de Patologia Investigativa e Comparada do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu/SP para os anticorpos RE, HER-2, p63 e CK5, e para os anticorpos CD10, BMI-1, MUC-1, ESA, CD44 e CD24, foi seguido o protocolo padronizado no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da FMRP – USP – Ribeirão Preto/SP.

Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma série de alcoóis. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos. As amostras foram submetidas à recuperação antigênica, utilizando tampão citrato pH 6,0 em Câmara Microprocessada de Pressão Pascal (Dako, EUA) durante 30 segundos a 125 °C, para os anticorpos RE, HER-2, p63 e CK5. A recuperação antigênica para os anticorpos CD10, BMI-1, MUC-1, ESA, CD44 e CD24 foi realizada em tampão citrato à 10 mM e colocados em panela a vapor por 40 minutos e, logo após, as amostras foram resfriadas por 30 minutos em temperatura ambiente e incubadas a 4° C overnight com o anticorpo primário.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o bloqueio pós-anticorpo primário por 30 minutos e então incubados com o polímero *NovoLink* (Novocastra Laboratories, Newcastle, Inglaterra) para a amplificação de sinal e para revelação a solução cromogênica de 3,3' diaminobenzidina (DAB) líquida (Dako, Carpinteria, EUA). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados e as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem Permount para leitura. Foram examinados todos os cilindros do TMA e foram consideradas células positivas aquelas coradas em castanho escuro após as reações.

Tabela 1. Anticorpos (Ac) utilizados nas marcações imunoistoquímicas: Diluição, fabricante, clone utilizado e ponto de corte para avaliar a positividade de cada marcador.

Anticorpo	Diluição	Fabricante	Clone	Ponto de Corte
MUC1	1:50	Biocare Medical, Concord, CA, USA	695	>10%= positivo
CD10	1:50	Santa Cruz, Palo Alto, USA	56C6	>10%= positivo
ESA	1:50	Santa Cruz, Palo Alto, USA	H-90	>10%= positivo
BMI1	1:50	Santa Cruz, Palo Alto, USA	H99	>10%= positivo
CD44	1:50	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	DF1485	>10%= positivo
CD24	1:50	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA	SN3b	>10%= positivo
ER	1:40	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	LH2	>10%= positivo
p63	1:150	Neomarkers, Fremont, CA, USA	4A4	>10%= positivo
HER-2	1:100	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	CB11	0 e 1+= negativo 2+ e 3+= positivo
CK5	1:50	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK	XM26	>10%= positivo

4.6 Leitura das Lâminas

A leitura das lâminas foi feita de acordo com o mapeamento prévio dos TMAs e para cada marcador foi utilizado uma graduação semi-quantitativa para avaliar os resultados da imunoistoquímica. Foi atribuído negativo (-) quando não havia marcação ou esta era em menos de 10% das células neoplásicas e a identificação da positividade variou em cada marcador como segue:

As marcações de RE foram consideradas positivas quando apresentaram marcação nuclear em mais de 10% das células, conforme o estabelecido por SCHMITT *et al.* (1995).

Graduações de intensidade de coloração para HER-2 foram estabelecidas por meio de análise óptica baseando-se no sistema de graduação Hercept Test® (Dako). Quando houve coloração completa de membrana de intensidade fraca a moderada em mais de 30% das células neoplásicas foi adotado positivo duas cruzes (+ +). Quando a coloração da membrana era completa e intensa, normalmente homogênea, foi adotado positivo três cruzes (+ + +).

As marcações de p63 foram consideradas positivas quando houve marcação nuclear (BHARGAVA *et al.*, 2010) em mais do que 10% das células neoplásicas.

Segundo Ramalho *et al.* (2006), a marcação de CK5 é considerada positiva quando houver marcação membranar em mais de 10% das células neoplásicas.

De acordo com Giatromanolaki *et al.* (2000) foi definido o corte para CD44 e CD24, marcação membranar e citoplasmática, respectivamente, considerando positivos quando mais de 10% das células fossem marcadas.

A marcação para CD10 foi considerada positiva quando houve marcação citoplasmática em mais de 10% das células (PURI *et al.*, 2011).

Qualquer marcação no epitélio mamário pode ser considerado positivo para BMI-1, de acordo com Joensuu *et al.*, 2011. Nesse estudo utilizamos o parâmetro de marcação citoplasmática em mais de 10% das células para considerar como positivos.

Para o corte que definiria os casos positivos e negativos para a MUC1 (marcação de membrana e citoplasma), foi seguido o critério estabelecido por Sangoi *et al.*, em 2009. Este critério estabelece que os casos MUC1 são considerados positivos quando tem mais de 10% das células marcadas com marcação membranar.

As amostras foram consideradas positivas quando houve marcação membranar em mais de 10% das células para ESA, segundo Qun *et al.*, 2009.

4.7 Classificação imunoistoquímica das amostras

Com os dados obtidos das reações imunoistoquímicas as amostras foram classificadas em:

- Luminal A: Apresentaram a marcação positiva para RE, negativa para HER-2 e p63 e CK5 negativas.
- Luminal B: Apresentaram a marcação positiva para RE, positiva para HER-2 e p63 e CK5 negativas.
- Superexpressão de HER-2: Apresentaram a marcação negativa para RE, positiva para HER-2 e p63 e CK5 negativas.
- Basal: Apresentaram a marcação negativa para RE, negativa para HER-2 e positivas para p63 e/ou CK5.

4.8 Análise Estatística

O Teste Qui-quadrado foi utilizado para estudar a associação entre as categorias dos marcadores de células-tronco, nos diferentes subtipos, com os grupos carcinomas simples e complexo. Além disso, os testes também avaliaram a diferença de proporções entre os subtipos, de acordo com a marcação para células-tronco nos grupos de carcinoma simples e complexo.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todos os cálculos foram analisados no programa SAS, versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC), no Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP/Botucatu.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Classificação Histopatológica

Dos 112 tumores analisados, 49 (43,75%) foram classificados em carcinoma simples, pois apresentavam apenas componente epitelial e 63 (56,25%) em carcinoma complexo, por apresentarem componentes epitelial e mioepitelial.

5.2 Classificação em Subtipos

Os 112 tumores de mama analisados foram divididos em subtipos distintos baseado nos resultados da marcação imunoistoquímica para receptor de estrógeno (Figura 3A), HER-2 (Figura 3B), p63 (Figura 4A) e CK5 (Figura 4B). Vinte e nove (25,89%) tumores que apresentaram positividade para receptor de estrógeno e foram negativos para os outros marcadores foram classificados no subtipo Luminal A. Trinta e oito (33,93%) foram classificados em Luminal B, pois apresentaram positividade para receptor de estrógeno e para HER-2, e foram negativos para os marcadores de células basais. Para o subtipo Superexpressão de HER-2, dezesseis tumores (14,29%) que apresentaram positividade para HER-2 e foram negativos para os outros marcadores e vinte e nove (25,89%) tumores que apresentaram positividade para os marcadores de células basais (p63 e/ou CK5) e foram negativos para receptor de estrógeno e HER-2, foram classificados em subtipo Basal.

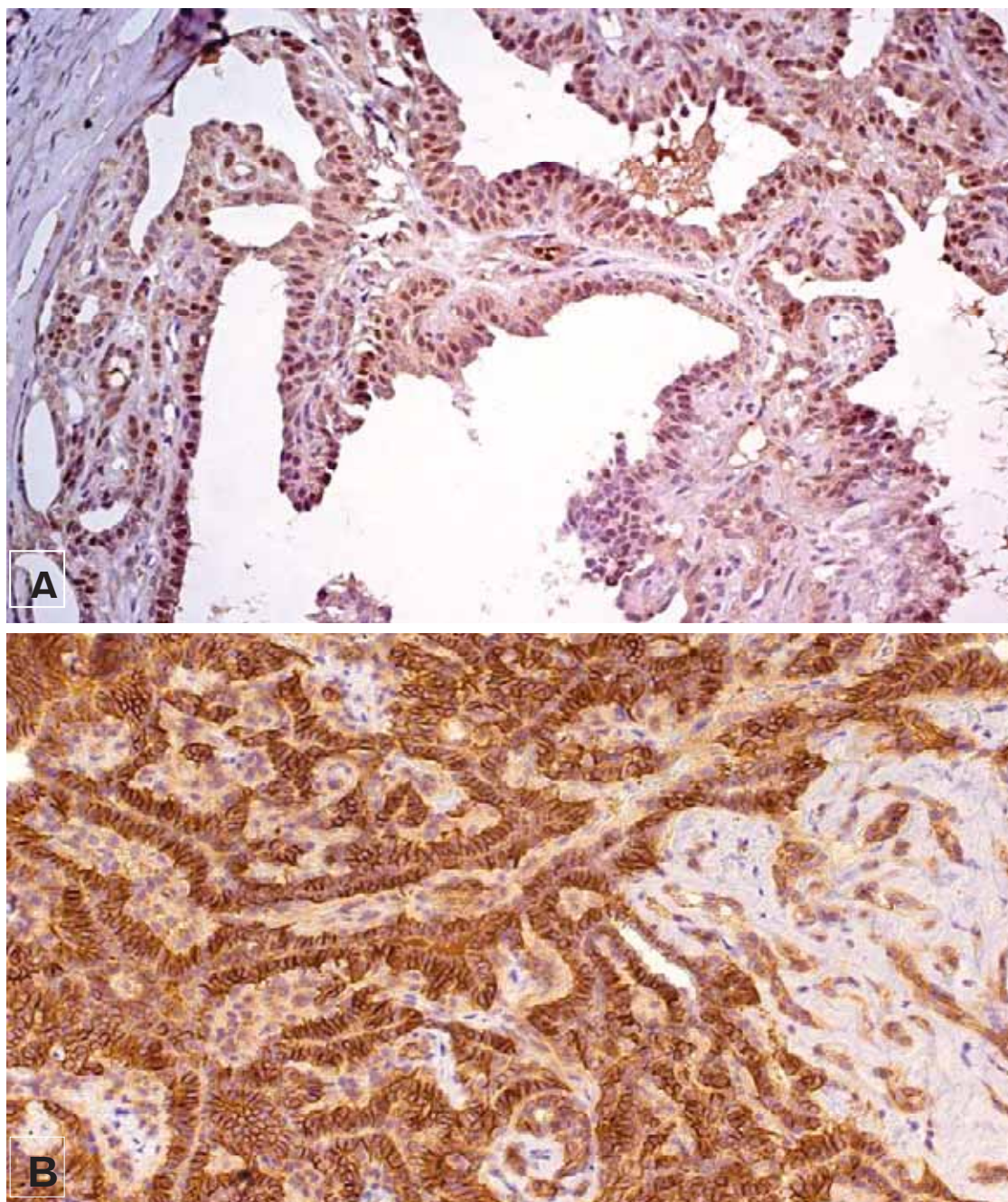


Figura 3. A) Marcação nuclear para receptores de estrógeno em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 200X. **B)** Marcação membranar para HER-2 em carcinoma simples de mama, positivo 3+, marcação completa de membrana, IHQ – Novolink®, 200X.

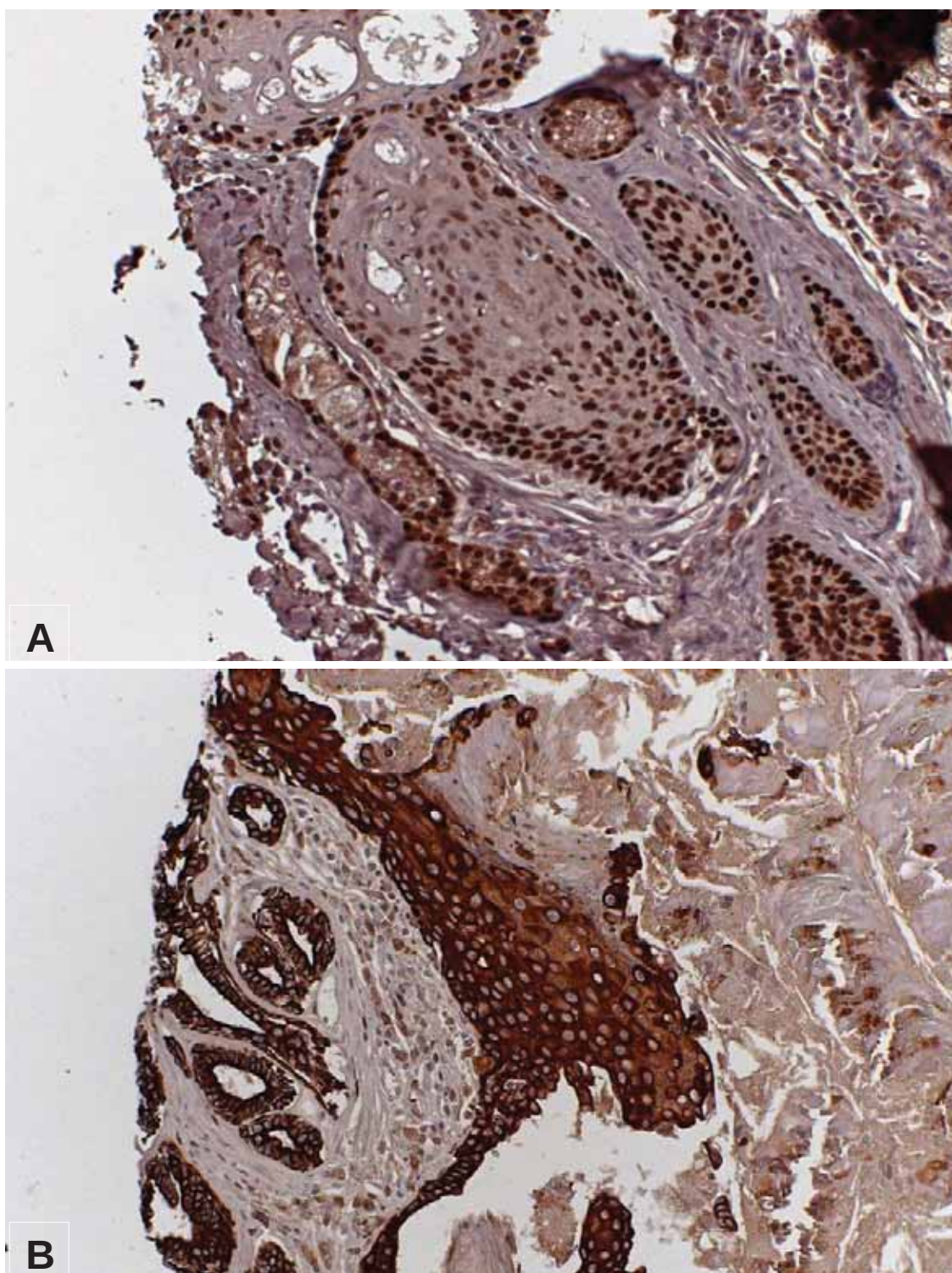


Figura 4. A) Marcação nuclear para p63 em carcinoma complexo de mama, evidenciando células mioepiteliais, IHQ – Novolink®, 200X. B) Marcação membranar para CK5 em carcinoma complexo de mama, IHQ – Novolink®, 200X.

5.3 Marcação das células-tronco tumorais

Para o subtipo Luminal A, dos 10 tumores classificados em carcinoma simples, seis foram positivos para CD10 (Figura 5), seis positivos para BMI-1 (Figura 6) e dois positivos para CD24 (Figura 7). Para os marcadores CD44, MUC-1 e ESA não houve nenhum tumor positivo. Ainda no subtipo Luminal A, 19 tumores foram classificados em carcinoma complexo, sendo 11 positivos para CD10, 15 positivos para BMI-1, 12 positivos para CD24, oito positivos para ESA (Figura 8) e quatro positivos para MUC-1 (Figura 9). Para o marcador CD44 não houve nenhum tumor positivo.

Dos tumores classificados em Luminal B, 15 eram carcinomas simples, dos quais 14 foram positivos para CD10, 13 positivos para BMI-1, um foi positivo para CD44 (Figura 10), 10 positivos para CD24, dois para ESA e três para MUC-1. Vinte e três tumores foram classificados em carcinoma complexo, dentre eles 17 foram positivos para CD10, 17 positivos para BMI-1, 15 foram positivos para CD24, dois positivos para ESA e oito para MUC-1. Não houve carcinoma complexo subtipo luminal B positivo para CD44.

Para os tumores que superexpressaram HER-2, 12 foram classificados em carcinoma simples, sendo que seis foram positivos para CD10, 10 foram positivos para BMI-1, dois apresentaram marcação para CD44, três marcaram para CD24, dois para ESA e dois para MUC-1. Dos carcinomas complexos que superexpressaram HER-2 (quatro), dois foram positivos para CD10, dois para BMI-1, dois para CD44, um positivo para CD24, um para ESA e para MUC-1 não houve positividade.

Para o subtipo Basal, 12 tumores foram classificados em carcinoma simples e apresentaram positividade para CD10 (oito), BMI-1 (cinco) e ESA (quatro). Para os marcadores, CD44, CD24 e MUC-1 não houve positividade. Dezessete tumores foram classificados em carcinoma complexo e houve positividade para CD10 (onze), BMI-1 (treze), CD44 (um), CD24 (cinco), ESA (cinco) e MUC-1 (seis).

Quatro tumores (3,57%) apresentaram marcação positiva para CD44 e foram negativos para CD24, sendo encaixados na categoria CD44+ CD24-, perfil descrito na literatura para marcação de células-tronco. Além dessa marcação, eles também foram positivos para o marcador ESA. Desses tumores, um pertence ao subtipo Superexpressão de HER-2 e os outros três eram do subtipo Basal.

Dezessete tumores (15,18%) apresentaram marcação positiva para ESA e foram negativos para MUC-1, sendo classificados como ESA+ MUC-1-, perfil utilizado para marcação de células progenitoras em cultivo celular. Desses tumores, cinco pertenciam ao subtipo Luminal A, dois ao subtipo Luminal B, três classificados como Superexpressão de HER-2 e sete tumores do subtipo Basal.

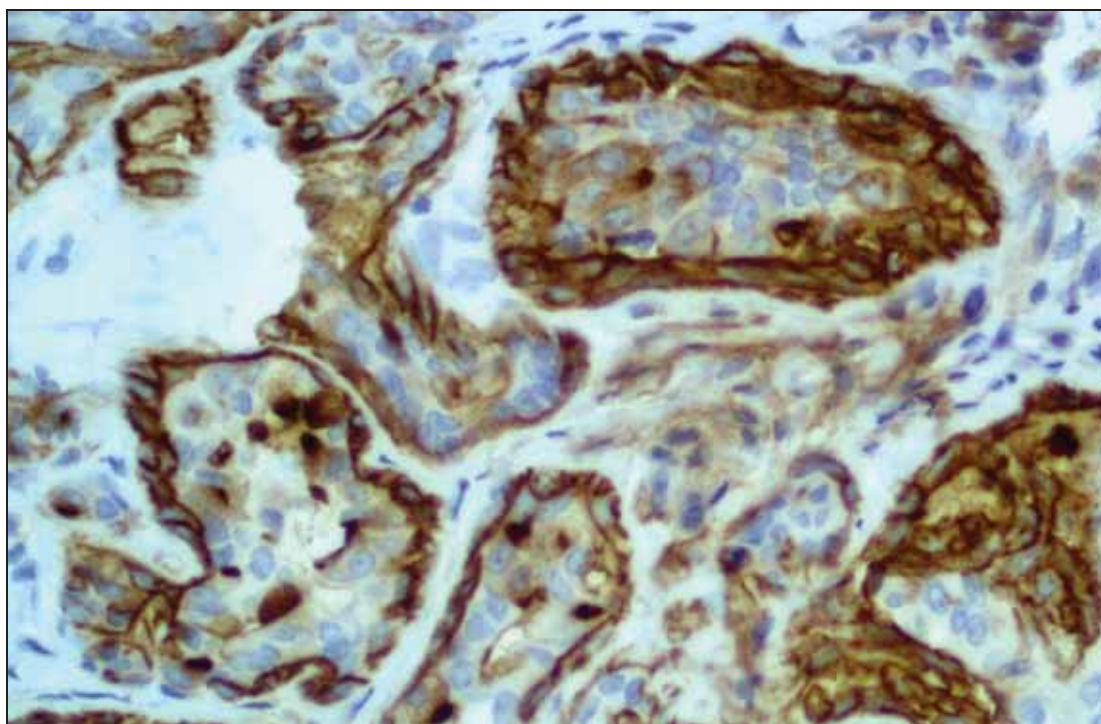


Figura 5. Marcação citoplasmática para CD10 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

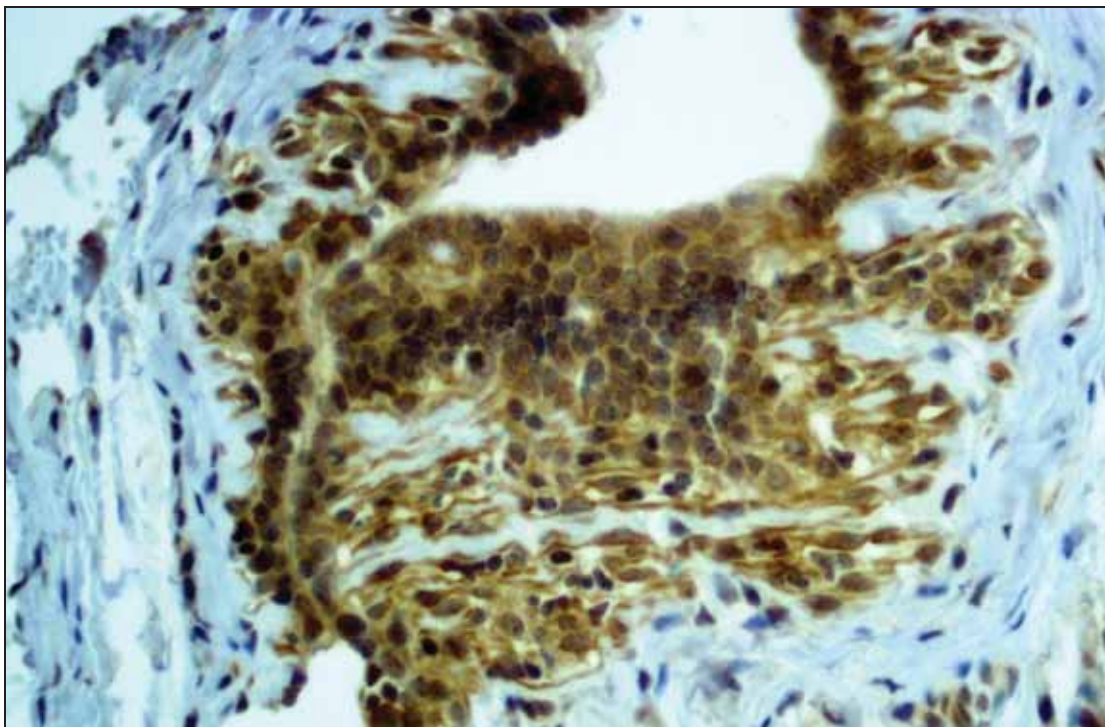


Figura 6. Marcação citoplasmática para BMI-1 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

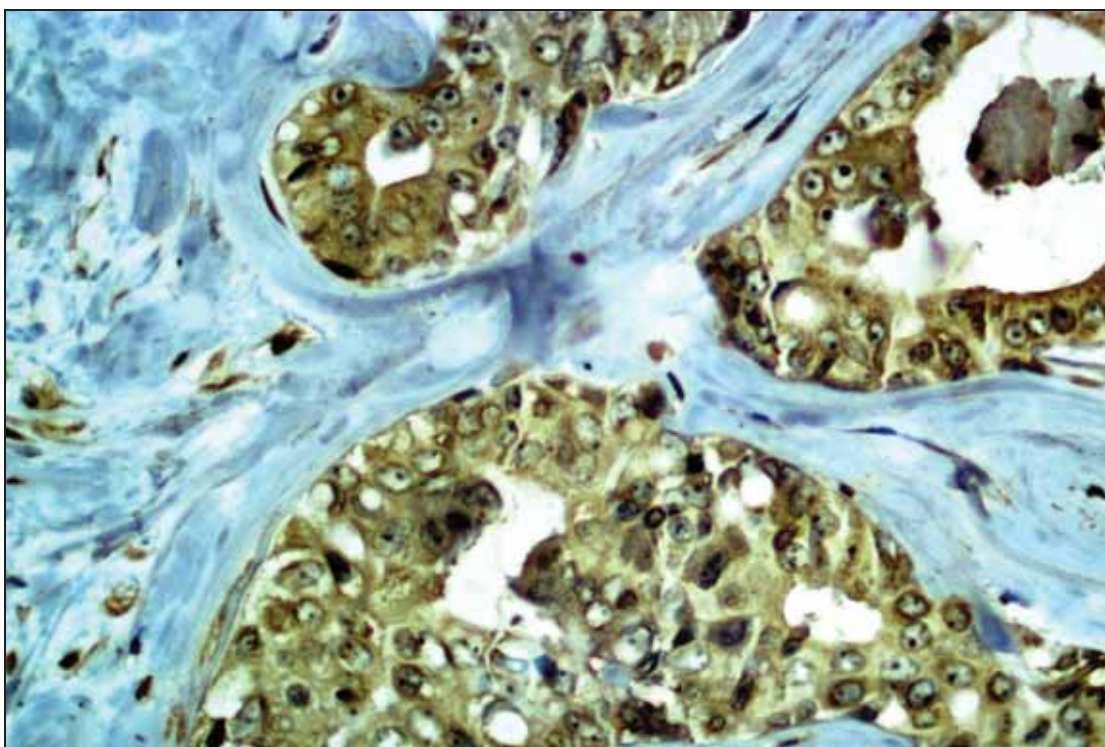


Figura 7. Marcação citoplasmática para CD24 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

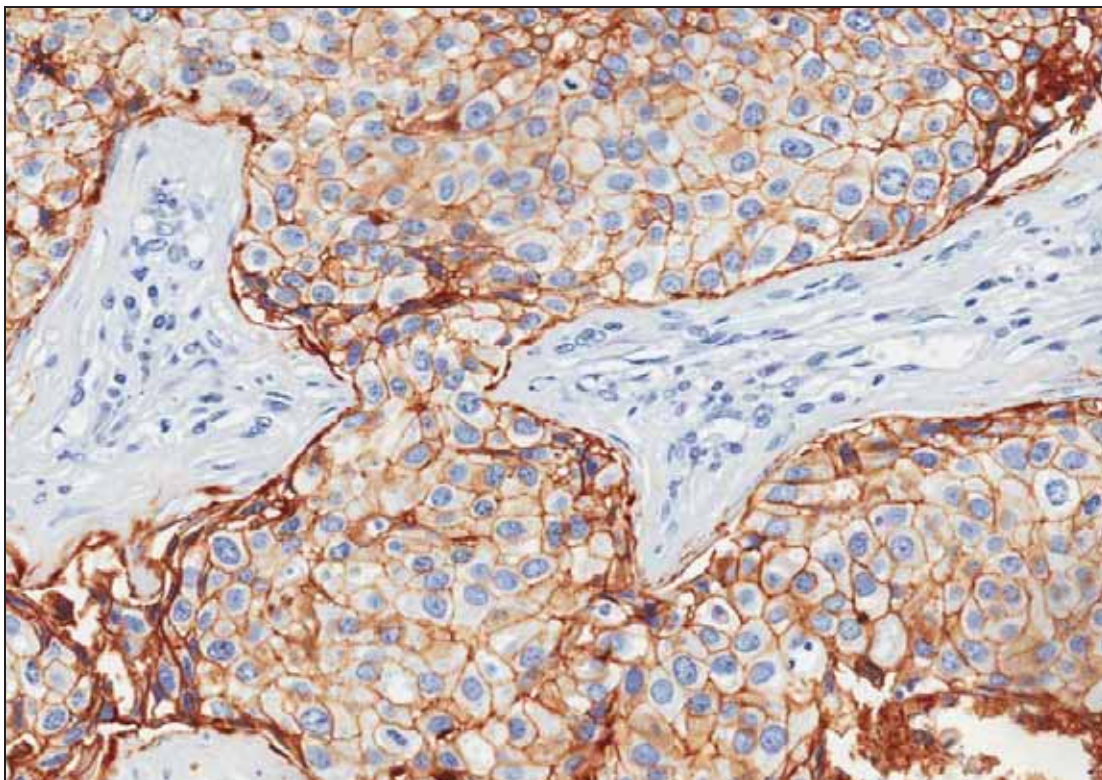


Figura 8. Marcação membranar para ESA em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

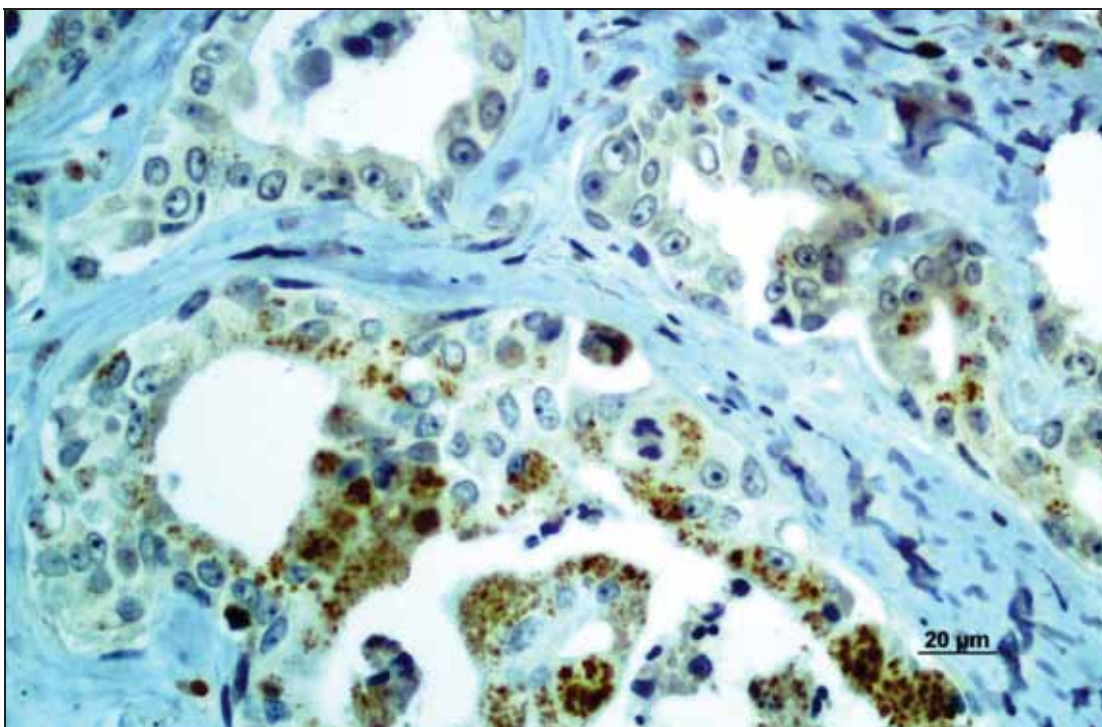


Figura 9. Marcação citoplasmática para MUC-1 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

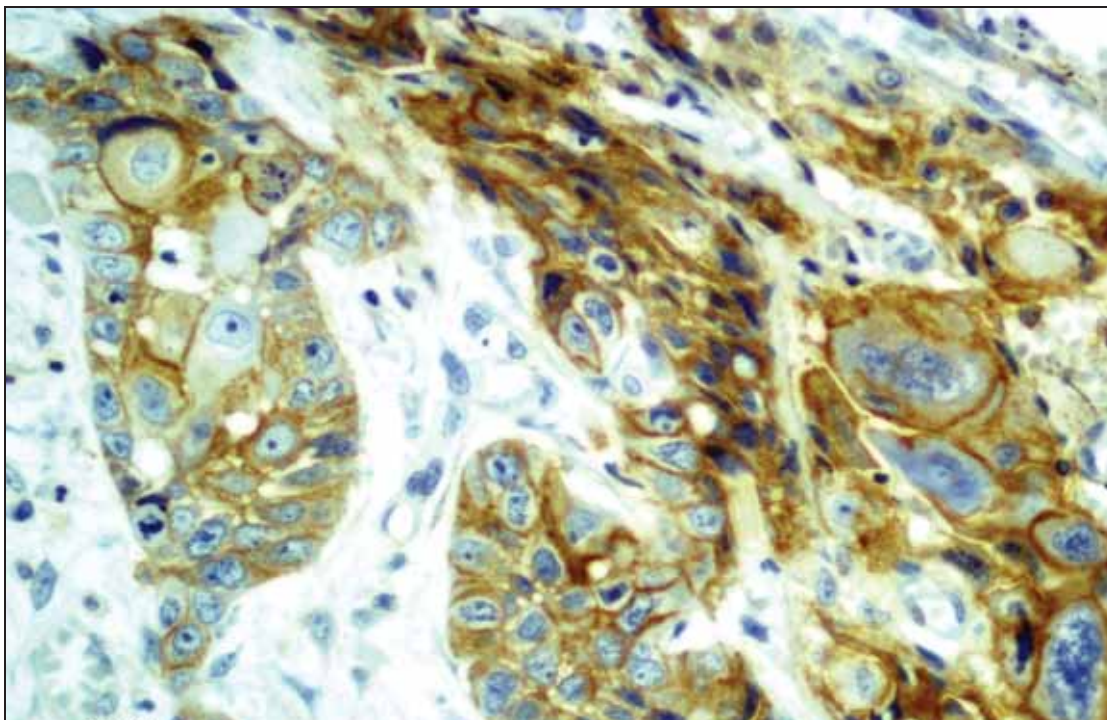


Figura 10. Marcação membranar para CD44 em carcinoma simples de mama, IHQ – Novolink®, 400X.

5.4 Análise estatística

Para o marcador CD10, não houve diferença de proporções entre os carcinomas simples e complexo dentro de todos os subtipos. Para a associação entre os subtipos, não houve diferença estatística no grupo de carcinomas simples. Entretanto, houve diferença estatística no grupo de carcinoma complexo do subtipo Superexpressão de HER-2 quando comparado aos demais subtipos ($p=0,0019$ e $\chi^2=14,9268$).

Para o marcador BMI-1, houve diferença de proporções entre carcinomas simples e complexo nos subtipos Luminal A ($p=0,01355$ e $\chi^2=6,0952$), Superexpressão de HER-2 ($p=0,004267$ e $\chi^2=8,1667$) e Basal ($p=0,01963$ e $\chi^2=5,444$), no subtipo Luminal B não houve diferença. Para a associação entre os subtipos, só houve diferença estatística no grupo de

carcinoma complexo do subtipo Superexpressão de HER-2 quando comparado aos demais subtipos ($p=0,00158$ e $\chi^2=15,2908$).

Para o marcador CD44 não houve diferença estatística quando aplicado o teste qui-quadrado para diferença de proporções e nem para a associação entre os subtipos em cada grupo de carcinomas simples e complexo.

Para o marcador CD24 houve diferença de proporções entre carcinomas simples e complexo nos subtipos Luminal A ($p=0,0007$ e $\chi^2=11,5714$) e Basal ($p=0,01141$ e $\chi^2=6,4$), nos demais subtipos não houve diferença. Para a associação entre os subtipos, houve diferença estatística no grupo de carcinoma simples do subtipo Luminal B ($p=0,00015$ e $\chi^2=20,1778$) quando comparado aos demais subtipos. Para o grupo de carcinoma complexo, houve diferença na associação entre os subtipos, sendo que o subtipo Luminal A se comportou igual ao Luminal B e o subtipo Superexpressão de HER-2 se comportou igual ao Basal ($p=0,00018$ e $\chi^2=19,8384$).

Para o marcador ESA houve diferença de proporções entre carcinomas simples e complexo apenas no subtipo Luminal A ($p=0,0005$ e $\chi^2=12,25$) e nos demais subtipos não houve diferença. Para a associação entre os subtipos não houve diferença no grupo dos carcinomas simples. Para o grupo de carcinoma complexo, houve diferença na associação entre os subtipos, sendo que o subtipo Luminal A se comportou igual ao Basal e o subtipo Luminal B se comportou igual ao Superexpressão de HER-2 ($p=0,0186$ e $\chi^2=10,00$).

Para o marcador MUC-1 houve diferença de proporções entre carcinomas simples e complexo nos subtipos Luminal A ($p=0,03389$ e $\chi^2=4,5$) e Basal ($p=0,003892$ e $\chi^2=8,3333$), nos demais subtipos não houve diferença. Para a associação entre os subtipos, houve diferença estatística no grupo de carcinoma complexo do subtipo Superexpressão de HER-2 ($p=0,01567$ e $\chi^2=10,3704$) quando comparado aos demais subtipos. Para o grupo do carcinoma simples não houve diferença na associação entre os subtipos.

Os testes estatísticos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Teste qui-quadrado (χ^2) para diferença de proporções e para a associação entre os subtipos para cada marcador de células-tronco nos carcinomas simples e complexo.

CD10

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	6 (10)	14 (15)	6 (12)	8 (12)	P=0,0805 $\chi^2=6,7451$
Complexo	11 (19)	17 (23)	2 (4)*	11 (17)	P=0,0019* $\chi^2=14,9268$
Valor P	0,1701	0,6115	0,1336	0,5164	
χ^2	1,8824	0,2581	2,25	0,4211	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). HER-2 difere dos demais.

BMI-1

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	6 (10)	13 (15)	10 (12)	5 (12)	P=0,09241 $\chi^2=6,4314$
Complexo	15 (19)	17 (23)	2 (4)*	13 (17)	P=0,00158* $\chi^2=15,2908$
Valor P	0,01355*	0,4286	0,004267*	0,01963*	
χ^2	6,0952	0,6	8,1667	5,444	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). HER-2 difere dos demais.

CD44

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	0 (10)	1 (15)	0 (12)	2 (12)	P=0,1801 $\chi^2=4,8889$
Complexo	0 (19)	0 (23)	1 (4)	2 (17)	P=0,1801 $\chi^2=0,1801$
Valor P	-	1,0	1,0	1,0	
χ^2	-	0,0	0,0	0,0	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). Não há diferenças.

CD24

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	2 (10)	10 (15)*	3 (12)	0 (12)	P=0,00015* $\chi^2=20,1778$
Complexo	12 (19)a	15 (23)a	1 (4)b	5 (17)b	P=0,00018* $\chi^2=19,8384$
Valor P	0,0007*	0,2579	0,4795	0,01141*	
χ^2	11,5714	1,28	0,5	6,4	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). Simple: LB difere dos demais; Complexo: LA=LB; HER-2=Basal.

ESA

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	0 (10)	2 (15)	2 (12)	4 (12)	P=0,149 $\chi^2=5,333$
Complexo	8 (19)a	2 (23)b	1 (4)b	5 (17)a	P=0,0186* $\chi^2=10,00$
Valor P	0,0005*	1	1,0	1,0	
χ^2	12,25	0	0,0	0,0	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). LA=basal; LB=HER-2.

MUC-1

Carcinoma	Luminal A	Luminal B	Superexpressão do HER-2	Basal	Valor
Simple	0 (10)	3 (15)	2 (12)	0 (12)	P=0,06579 $\chi^2=7,20$
Complexo	4 (19)	8 (23)	0 (4)*	6 (17)	P=0,01567* $\chi^2=10,3704$
Valor P	0,03389*	0,08808	0,3173	0,003892*	
χ^2	4,5	2,9091	1,0	8,3333	

*Diferenças estatísticas ($p<0,05$). HER-2 difere dos demais.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Subtipos de tumores de mama

Há escassez de estudos correlacionando a imunoexpressão de proteínas com a expressão morfológica em tumores de mama de cadelas. O predomínio de diagnóstico de carcinoma complexo comparado com o de carcinoma simples está de acordo com a literatura (HATAKA, 2004). A caracterização imunoistoquímica da expressão de proteínas é de grande auxílio para a avaliação do prognóstico da neoplasia, pois evidencia células nem sempre identificadas na histopatologia convencional, corada em HE.

Neoplasias com positividade para receptores de estrógeno são consideradas de bom prognóstico na Medicina Humana, principalmente por sua resposta à terapia com medicamentos anti-hormonais (SILVA *et al.*, 2004). Em Medicina Veterinária ainda não há um consenso a esse respeito (SILVA *et al.*, 2004). Os resultados mostram que a positividade para RE foi maior nos carcinomas complexos (42 tumores) do que nos carcinomas simples (25 tumores), corroborando com a literatura (DE LAS MULAS *et al.*, 2004), sugerindo que os carcinomas complexos apresentam melhor prognóstico do que o carcinoma simples.

Estima-se que cerca de uma em cada cinco mulheres com câncer de mama metastático é HER-2 positiva e pesquisas recentes sugerem que essas pacientes são as que, provavelmente, terão uma forma mais agressiva de câncer de mama (TSUDA, 2006). Em cadelas existem poucos estudos relacionando positividade para HER-2 e neoplasia mamária. Contudo, Dutra *et al.* (2004) verificaram a positividade em tumores de mama malignos de cadelas e afirmaram que essa imunoexpressão pode caracterizar um importante papel na carcinogênese do tumor mamário, uma vez que em humanos já está estabelecido que o gene c-erbB-2 (responsável pela produção da proteína HER-2) relaciona-se com a iniciação do câncer de mama e tem sido utilizado

como alvo de terapia genética. No presente estudo houve diferença estatística entre a positividade para os carcinomas simples (12 tumores) e complexos (4 tumores) ($p=0,004267$ e $\chi^2=8,166$), evidenciando uma maior agressividade dos carcinomas simples.

A p63 é útil para caracterizar as células mioepiteliais da mama e assim tentar elucidar a histogênese do tumor (BERTAGNOLLI, 2006), já que é considerado um possível marcador para as células-tronco (SIGNORETTI *et al.*, 2000; RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2003).

A positividade para CK5 em carcinomas mamários na mulher correlaciona-se com indicadores de mau prognóstico, incluindo idade precoce, alto grau histológico, linfonodos positivos, estágio patológico avançado e negatividade para receptores hormonais (VALE, 2006).

A marcação para p63 e CK5, utilizada para classificar o subtipo Basal, demonstrou as células basais da mama, que podem ter características de células-tronco, contribuindo para a progressão e manutenção das células tumorais. Neste estudo houve uma maior expressão desses marcadores nos carcinomas complexos (17 tumores), enquanto os carcinomas simples apresentaram positividade para esses marcadores em 12 tumores. Os achados estão de acordo com a literatura, que relata positividade para células malignas com prognóstico desfavorável (ZUCCARI *et al.*, 2004).

6.2 Marcadores de células-tronco tumorais

Não há relatos na literatura da utilização dos marcadores CD10, BMI-1, CD44, CD24, ESA e MUC-1 nas mesmas amostras de carcinomas mamários de cadelas, o que faz deste o primeiro trabalho para avaliação da marcação das células-tronco tumorais em Medicina Veterinária.

O CD10, também conhecido como antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda (do inglês “common acute lymphoblastic leukemia antigen - CALLA”), é uma metaloproteinase da membrana celular, a qual é expressa em

vários tecidos, incluindo as células mioepiteliais da mama (MORITANI *et al.*, 2002). Nesse estudo, houve diferença ($p < 0,05$) na marcação do CD10 em carcinomas complexos do subtipo Superexpressão de HER-2 ($p = 0,0019$ e $\chi^2 = 14,9268$), quando comparado aos outros subtipos. Nos casos em que as células perdem a metilação do CD10 ocorre um aumento da migração, crescimento e sobrevivência celular contribuindo para o desenvolvimento e progressão neoplásica (PAPANDREOU & NANUS, 2010). Segundo Wagoner *et al.* (2007) o CD10 geralmente reduz a resposta celular a peptídeos hormonais e a quantidade de CD10 expresso parece se relacionar com a taxa de crescimento celular e em células de neoplasias malignas ocorre um aumento do índice proliferativo (WAGONER *et al.*, 2007). Diversos relatos indicam que a expressão de CD10 está associada a um comportamento biológico agressivo em várias neoplasias epiteliais (CHEN *et al.*, 2000), o que corrobora com o resultado já que o subtipo Superexpressão de HER-2 é considerado um dos mais agressivos.

Kim *et al.* (2004) demonstraram uma superexpressão de BMI-1 em câncer de mama e encontraram uma alta expressão que se correlacionou com metástases para linfonodo axilar. Eles sugeriram que a desregulação do ciclo celular pelo BMI-1 pode desempenhar um papel importante na progressão do câncer de mama e metástases para linfonodos. Al-Hajj *et al.* (2006) descreveram a existência de população de células-tronco tumorais em tumores de mama e estas apresentavam um aumento na expressão de BMI-1 (LIU *et al.*, 2006). A superexpressão de BMI-1 se correlaciona com um prognóstico ruim em carcinoma hepatocelular e nasofaríngeal, assim como em tumores neurais, classificados em oligodendrogliomas e meduloblastomas (WANG *et al.*, 2008 e HÄYRY *et al.*, 2008). Além disso, há relatos de correlação entre expressão de BMI-1 e estágios avançados de câncer de pulmão (VRZALIKOVA *et al.*, 2008). No presente estudo, houve diferença ($p < 0,05$) na marcação do BMI-1 em carcinomas complexos do subtipo Superexpressão de HER-2 ($p = 0,00158$ e $\chi^2 = 15,2908$), quando comparado aos outros subtipos, o que sugere uma maior agressividade desse subtipo nessas amostras, com um grande potencial de produzir metástases.

Para o marcador CD44 houve uma positividade em poucas amostras desse estudo, uma para o subtipo Luminal B, uma para o subtipo Superexpressão de HER-2 e quatro amostras positivas para o subtipo Basal, ou seja, dos 112 tumores apenas seis amostras (5,36%) apresentaram marcação para CD44 e não houve diferença estatística entre os subtipos. O padrão de expressão de CD44 tem sido associado com a facilitação da progressão do câncer de mama por meio da alteração das características de adesão da célula tumoral e com isso facilitando a invasão vascular no tecido (DRAFFIN *et al.*, 2004). Embora a relação entre a expressão de CD44 e outras características clínico-patológicas do câncer de mama tem sido alvo de debates, muitos estudos sugerem que a expressão de CD44 se correlaciona com metástase tumoral e pode ser útil para indicar o prognóstico (LOPEZ *et al.*, 2005). Relacionando os dados da literatura com os resultados obtidos (maior positividade para tumores do subtipo Basal) pode-se inferir que a expressão de CD44 sugere um prognóstico ruim, confirmando a característica esperada dos tumores Basais.

O CD24 é altamente expressado em carcinomas de ovário, mama, próstata, bexiga e renal (ZHENG *et al.*, 2011) e está envolvido na adesão celular e metástase (LEE *et al.*, 2010), o que pode indicar um marcador importante no diagnóstico e prognóstico tumoral. Funcionalmente ele é identificado como uma ligação alternativa para a P-seletina, um receptor de adesão de plaquetas e células endoteliais, através do qual sua interação pode facilitar a passagem de células tumorais para a corrente sanguínea, promovendo metástases (AIGNER *et al.*, 1998). A associação entre metástase e expressão aumentada de CD24 é um importante fator prognóstico além de ser um marcador para células-tronco tumorais (LEE *et al.*, 2010). Os resultados desse estudo demonstram uma maior positividade para os carcinomas complexos de ambos os subtipos, apresentando diferença estatística na avaliação de diferença de proporções entre os subtipos: Luminal A = Luminal B e Superexpressão de HER-2 = Basal ($p=0,00018$ e $\chi^2=19,8384$). Para os carcinomas simples só houve diferença ($p<0,05$) na avaliação de diferença de proporções no subtipo Superexpressão de HER-2 ($p=0,00015$ e $\chi^2=20,1778$). Além disso, também houve diferença estatística ($p<0,05$) dentro de cada um

dos subtipos quando comparados entre carcinomas simples e complexos, para o subtipo Luminal A foi encontrado $p=0,0007$ e $\chi^2= 11,5714$, e para o Basal, $p=0,01141$ e $\chi^2= 6,4$.

A maioria dos estudos em células-tronco tumorais são nas proteínas transmembrânicas CD44 e CD24. Uma subpopulação de células tumorais que expressam fortemente o CD44 mas não o CD24 (fenótipo CD44+CD24-/baixo) foi identificada como célula-tronco tumoral por Al-Hajj *et al.* (2003) e subsequentemente confirmada por outros autores. Essas células neoplásicas CD44+CD24- são até 100 vezes mais tumorigênicas do que as que não exibem esse imunofenótipo (AL-HAJJ *et al.*, 2003). Num estudo de carcinogênese mamária foi demonstrado por Al-Hajj *et al.* (2003) que células da linhagem CD44+CD24- injetadas na gordura mamária de camundongos não obesos e com severa imunodeficiência (NOD/SCID) foram capazes de formar tumores palpáveis, mesmo quando poucas células foram implantadas. Além disso, foi observado que as células implantadas da linhagem CD44+CD24- não apenas deram origem a células com o mesmo imunofenótipo como também originaram células com imunofenótipo distintos, indicando que as células-tronco tumorais da mama podem gerar uma população homogênea de células não tumorigênicas além de dar origem a novas células-tronco tumorais. Células com imunofenótipo CD44+CD24- estão presentes em 22 a 31% dos carcinomas mamários humanos, nesse estudo foi encontrado quatro tumores positivos para esse imunofenótipo, totalizando 3,57% dos carcinomas mamários de cadelas. Dos quatro positivos, um tumor era do subtipo Superexpressão de HER-2 e três tumores, Basal. Apesar da porcentagem de positivos para esse imunofenótipo ser bem menor do que o descrito na literatura para humanos, o fato de ter sido positivo nos dois subtipos com comportamento mais agressivo sugere que essa classificação deva ser considerada para avaliar o prognóstico da neoplasia em cadelas, além de servir como modelo experimental para novos tratamentos.

O antígeno epitelial específico – ESA (do inglês “epithelial specific antigen”) é descrito na literatura como um dos marcadores de células-tronco tumorais de câncer de mama positivos para receptores de estrogênio (SPIZZO *et al.*, 2004). Neste trabalho, porém, também houve casos positivos para

subtipos que não são receptores de estrógeno positivos. Para o subtipo Luminal A houve positividade apenas para os carcinomas complexos o que garantiu uma diferença ($p < 0,05$) quando comparado ao carcinoma simples ($p = 0,0005$ e $\chi^2 = 12,25$). Dos casos classificados em Luminal B, dois carcinomas simples e dois carcinomas complexos foram positivos para ESA, não representando diferença estatística. Do subtipo Superexpressão de HER-2, dois carcinomas simples e um carcinoma complexo foram positivos, sem apresentar diferença estatística. Para o subtipo Basal, quatro carcinomas simples e cinco carcinomas complexos foram positivos para ESA, mas não apresentaram diferença estatística. Já na avaliação da associação entre os subtipos, houve diferença ($p < 0,05$) na comparação entre os carcinomas complexos ($p = 0,0186$ e $\chi^2 = 10,00$), sendo que o subtipo Luminal A foi igual ao Basal e o Luminal B igual ao Superexpressão de HER-2.

Há um aumento no interesse do papel das mucinas no câncer de mama devido ao seu potencial como indicador de prognóstico e seu envolvimento na terapia contra o câncer (RAKHA *et al.*, 2005). Pacientes com tumores MUC1 positivos desenvolvem tanto uma resposta humoral quanto uma resposta celular contra os antígenos da MUC1 provenientes das células malignas (HEUSER *et al.*, 2003) e por causa disso, atualmente vem sendo desenvolvido várias vacinas baseadas na MUC1 para o tratamento desta doença (HUYN *et al.*, 2009). A MUC1 geralmente está presente na superfície apical das células epiteliais secretoras e também em tecidos malignos podendo ser superexpressa em até 90% dos casos de câncer de mama (HATTRUP & GENDLER, 2006). Esta superexpressão permite a formação de tumores porque a MUC1 interage com vários fatores de transcrição, como por exemplo, a p53, os receptores hormonais (RE e RP) (BRAYMAN *et al.*, 2007) β -catenina, entre outros. A MUC1 também participa na modulação de várias vias importantes de sinalização celular (HATTRUP & GENDLER, 2006; YIN *et al.*, 2007). Além disto, a superexpressão da MUC1 leva à perda da adesão célula-célula e célula-matriz, o que favorece metástases (ABBA *et al.*, 2006; GIATROMANOLAKI *et al.*, 2000). No presente estudo houve diferença ($p < 0,05$) na comparação das proporções entre carcinomas simples e complexo, nos subtipos Luminal A ($p = 0,03389$ e $\chi^2 = 4,5$) e Basal ($p = 0,003892$ e

$\chi^2=8,3333$). Na associação entre os subtipos, houve diferença ($p<0,05$) nos carcinomas complexos que superexpressaram HER-2 ($p=0,01567$ e $\chi^2=10,3704$). Era esperada uma maior expressão nos subtipos mais agressivos, entretanto a positividade para o subtipo Luminal A sugere que este marcador pode não ter um papel definitivo na elaboração do prognóstico em neoplasias de mama de cadelas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A marcação para identificar as células-tronco tumorais é de grande valia para a correta elaboração do prognóstico e tratamento a ser seguido. A definição dos marcadores a serem utilizados dependerá de novos estudos com diferentes amostras de tumores de mama em cadelas, para confrontar com os dados desta pesquisa e determinar os marcadores mais indicados.

Ao contrario do que era esperado, houve mais marcações de células-tronco tumorais em carcinomas classificados em complexo. Esse resultado sugere que os carcinomas complexos são mais agressivos do que a literatura vem apresentando ao longo dos anos.

Além disso, houve uma significativa expressão dos marcadores de células-tronco tumorais nos subtipos Superexpressão de HER-2 e Basal, corroborando com a literatura que demonstra que tais subtipos são os mais agressivos para a mulher.

Com os resultados apresentados, pode-se ainda indicar a cadela para ser utilizada como modelo experimental para pesquisas em tumor de mama, principalmente para o subtipo Basal, uma vez que ela compartilha os mesmos marcadores com o câncer de mama na mulher, ainda que em diferentes proporções.

O fato de não haver dados na literatura sobre essas marcações em carcinomas mamários de cadela torna este trabalho ainda mais relevante para a comunidade científica.

Referências

8. REFERÊNCIAS*

ABBA, M. C.; NUNEZ, M. I.; COLUSSI, A. G.; CROCE, M. V, SEGAL-EIRAS, A., ALDAZ, C. M. GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, London, v. 8, n. 6, p. R64, 2006.

ABRAHAM, B. K.; FRITZ, P.; MCCLELLAN, M. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 3, p. 1154-9, 2005.

AFIFY, A.; PURNELL, P.; NGUYEN, L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. **Exp Mol Pathol** 86:95–100, 2009.

AIGNER, S.; RAMOS, C. L.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; LAWRENCE, M. B.; FRIEDERICH, J.; ALTEVOGT, P.; LEY, K. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. **FASEB J** 12:1241–1251, 1998.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(7):3983–3988, 2006

AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITOHERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, 2003.

ALLEN, S.W.; PRASSE, K.W.; MAHAFFEY, E.A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.23, n.6, p.649-655, 1986.

ARAUJO, R.W.; PAIVA, V.; GARTNER, F.; AMENDOEIRA, I.; OLIVEIRA, J.M.; SCHMITT, F.C. Fine needle aspiration as a tool to establish primary human breast cancer cultures in vitro. **Acta Cytologica**, v.43, p.985-990, 1999.

AUSTRALIAN INSTITUTE OF HEALTH AND WELFARE & AUSTRALASIAN ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES 2010. **Cancer in Australia 2010: an overview**. Cancer series no 60. Cat. no CAN 56. Canberra: AIHW.

BARBARESCHI, M.; PECCIARINI, L.; CANGI, M.G.; MACRI, E.; RIZZO, A.; VIALE, G. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. **Am J Surg Pathol**, v. 25: 1054-1060, 2001.

BARGMAN, C.I.; HUNG, M.C.; WEINBERG, R.A. The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. **Nature**; 319: 226-230, 1986.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS - ABNT. NBR 6023: informação e documentação – referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNÜRCH, H. G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **J Mol Med**, 75:429–439, 1997.

BERTAGNOLLI, A. C. Expressão de p63 e p53 em tumores mamários mistos de cadelas. [dissertação]. Santa Maria: **Universidade Federal de Santa Maria**; 2006.

BHARGAVA, R.; ESPOSITO, N.N.; DABBS, D.J. Immunohistology of the breast. In: DABBS, D.J. **Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic applications**. Philadelphia: Saunders, p.763-819, 2010.

BIRNBAU, M. D., BERTUCCI, F., GINESTIER, C., TAGETT, R., JACQUEMIER, J., CHARAFE-JAUFFRET, E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? **Int J Oncol**; 25:249–258, 2004.

BÖCKER, W.; BIER, B.; LUDWIG, A. Benign proliferative lesions and *in situ* carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. **Eur J Cancer Prev**; 2: 41–49, 1993.

BÖCKER, W.; MOLL, R.; POREMBA, C. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Lab Invest**; 82: 737-745, 2002a

BORBA, M. A. M. Análise da expressão imunoistoquímica da p63 e de seu valor prognóstico em carcinomas epidermóides da laringe [Tese]. São Paulo. **Faculdade de Medicina** da Universidade de São Paulo, 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2. 2011. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf> Acesso em: 05 mai 2012.

BRAYMAN, M. J., DHARMARAJ, N., LAGOW, E., CARSON, D. D. MUC1 Expression Is Repressed by Protein Inhibitor of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription-γ. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v; 21, p. 2725-2737, 2007.

BRUCE, W.R.; VAN DER GAAG, H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation *in vivo*. **Nature** 199, 79-80, 1963.

BUBENDORF, L; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol**; 195: 72–79, 2001a.

BUBENDORF, L. High-Throughput Microarray Technologies: From Genomics to Clinics. **Eur Urol**; 40: 231-238, 2001b.

BURINI, C.H.P. Caracterização clínica, citopatológica e bioquímica do câncer mamário de cadelas sem raça definida. [dissertação]. Botucatu: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista; 2002.

CAMERON, H.L.; FOSTER, W.G. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. **Phos one**, v.4, n.4303, p.1-8, 2009.

CAMPBELL, L. L. and POLYAK, K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? **Cell Cycle** 6, 2332-2338, 2007.

CANADIAN CANCER SOCIETY, STATISTICS CANADA, PROVINCIAL/TERRITORIAL CANCER REGISTRIES, PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. Canadian cancer statistics 2009. Disponível em: <hppt://www.cancer.ca/canada-wide/about%20cancer/cancer%20statistics> Acesso em: 05 mai 2012.

CARIATI, M.; PURUSHOTHAM, A. D. Stem cells and breast cancer. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 99-107, 2008.

CASSALI, G.D. Estudo morfológico, imunoistoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. [tese]. Belo Horizonte: **Escola de Veterinária**, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

CHEN, C.M.; CHEN, C.J.; CHANG, C.L.; SHYU, J.S.; HSIEH, H.F.; HARN, H.J. CD34, CD117, and actin expression in phyllodes tumor of the breast. **J Surg Res**;94(2):84–91, 2000.

CLAYTON, H.; TITLEY, I.; VIVANCO, M. D. M. Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. **Experimental Cell Research**, New York, v. 297, n. 2, p. 444-60, 2004.

COBALEDA, C.; JOCHUM, W.; BUSSLINGER, M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. **Nature** 449, 473-477, 2007.

COCKER, T.; GEORGE, D.; SHIELDS, R. Estrogen receptors and prognosis in early breast cancer. **Lancet**, 1969; 1: 995-997.

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, n. 23, p. 10946-51, 2005.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 10158-10163, 2007.

DE LAS MULAS, J. M., MILLÁN, Y., DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor α and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Vet Pathol**, 42:200–212, 2005.

DE LAS MULAS, J. M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, Y.; FERNÁNDEZ-SORIA, V.; RAMÓN, Y.; CAJAL, S. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Res Treat**, 80:363–367, 2003.

DE LAS MULAS, J.M.; ORDÁS, J.; MILLÁN, M.Y.; CHACÓN, F.; De LARA, M.; De LOS MONTEROS, A.E.; REYMUNDO, C.; JOVER, A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor β in normal and tumoral canine mammary glands. **Vet Pathol**, 41: 269-272, 2004.

DE LAURENZI, V.; MELINO, G. Evolution of functions within the p53/p63/p73. **Ann N Y Acad Sci**, 2000; 926: 90-100.

DESTEXHE, E.; LESPAGNARD, L.; DEGEYTER, M.; HEYMANN, R.; COIGNOUL, F. Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial and connective tissue cell in canine mammary tumors. **Vet Pathol**; 30: 146-154, 1993.

DHAWAN, S.; TSCHEN, S.I.; BHUSHAN, A. Bmi-1 regulates the Ink4a/Arf locus to control pancreatic beta-cell proliferation. **Genes Dev**. 23, 906-911, 2009.

DRAFFIN, J.E.; MCFARLANE, S.; HILL, A.; JOHNSTON, P.G.; WAUGH, D.J.J.; CD44 potentiates the adherence of metastatic prostate and breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. **Cancer Research** 64, 5702–5711, 2004.

DUNNWALD, L.K.; ROSSING, M.A.; LI, C. I. Hormone Receptor Status, Tumor Characteristics, and Prognosis: A Prospective Cohort of Breast Cancer Patients. **Breast Cancer Res.**; 9:(1), 2007.

DURANTE, F. Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei Nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch. Memor.* **Observ. Chir. Pract.** 11, 217-226, 1874.

DUTRA, A.P.; GRANJA, N.V.M.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Braz J Med Biol Res.**; 37: 11, 2004.

ELLSWORTH, R. E.; ELLSWORTH, D. L.; PATNEY, H. L.; DEYARMIN, B.; LOVE, B.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. **BMC Cancer**, 8:297, 2008.

FANTON, J.W.; WITHROW, S.J. Canine mammary neoplasia: an overview. **California Veterinarian**, v.7, p.12-16, 1981.

FERREIRA, E., CASSALI, G.D. Levantamento dos tumores mamários em cadelas no Hospital Veterinário da EV/UFG. In: **XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária** – Botucatu – SP, 2003. Anais, p.258.

FIGUEIROA, F C. Imunoexpressão de receptores de estrógeno e progesterona, HER-2, P63, CK5, Catepsina D e Proteína S100A4 em carcinoma espontâneo de mama em cadelas. [dissertação]. Botucatu: **Faculdade de Medicina de Botucatu**, Universidade Estadual Paulista, 2009.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v.453, p.123-132, 2008.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **Vet Rec**, v.146, p. 403-406, 2000.

GIATROMANOLAKI, A., KOUKOURAKIS, M. I., SIVRIDIS, E., O'BYRNE, K., COX, G., THORPE, P. E., *et al.* Coexpression of MUC1 Glycoprotein with Multiple Angiogenic Factors in Non-Small Cell Lung Cancer Suggests Coactivation of Angiogenic and Migration Pathways. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p.1917-1921, 2000.

GINJALA, V.; NACERDDINE, K.; KULKARNI, A.; OZA, J.; HILL, S.J.; YAO, M.; CITTERIO, E.; VAN LOHUIZEN, M.; GANESAN, S. BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. **Mol. Cell. Biol.** 31, 1972-1982, 2011.

GLICKMAN, J.N.; YANG, A.; SHAHSAFAEI, A.; MCKEON, F.; ODZE, R.D. Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. **Hum. Pathol**, 32: 1157-65, 2001.

GRANDI, F.; COLODEL, M.M.; MONTEIRO, L.N.; LEÃO, J.R.V.P.; ROCHA, N.S. Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. **BMC Veterinary Research**, v.6, p.45, 2010.

GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R.; DAIRKEE, S.H.; HUNT, J.E.; NAYDAN, D.K.; HIGGINS, R.J. Immunohistochemical reactivity of basal and luminal epithelium-specific cytokeratin antibodies within normal and neoplastic canine mammary glands. **Vet Pathol**; 30: 155-161, 1993.

GUPTA, P. B.; ONDER, T.T.; JIANG, G.; TAO, K.; KUPERWASSER, C.; WEINBERG, R.A.; LANDER, E.S. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. **Cell**. Aug 21;138(4):645-59, 2009.

GUSTERSON, B.; ROSS, D. T.; HEATH, V. J.; STEIN, T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast cancer research**. BCR, v. 7, n. 4, p. 143-8, 2005.

HALL, P.A.; WOODMAN, A.C.; CAMPBELL, S.J.; SHEPHERD, N.A. Expression of the p53 homologue p63alpha and DeltaNp63alpha in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus: correlation with morphology and p53 protein. **Gut**, 49: 618-23, 2001.

HAMBURGER A. W.; SALMON S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells. **Science** 197, 461-463, 1977.

HATAKA, A. Citologia aspirativa por agulha fina e histopatologia: valor e significado para diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas. [tese] Botucatu: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista; 2004

HATTRUP, C. L.; GENDLER, S. J. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, London, v. 8, n. 4, p. R37, 2006.

HÄYRY, V.; TYNNINEN, O.; HAAPASALO, H.K.; WÖLFER, J.; PAULUS, W.; HASSELBLATT, M.; SARIOLA, H.; PAETAU, A.; SARNA, S.; NIEMELÄ, M. WARTIOVAARA, K.; NUPPONEN, N.N. Stem cell protein Bmi-1 is an independent marker for poor prognosis in oligodendroglial tumors. **Neuropathol Appl Neurobiol** 34(5):555–563, 2008.

HERSH, L.B.; RODGERS, D.W. Neprilysin and amyloid beta peptide degradation. **Curr Alzheimer Res**; 5:225-31, 2008.

HEUSER, C., GANSER, M., HOMBACH, A., BRAND, H., DENTON, G., HANISCH, F. G., *et al.* An anti-MUC1-antibody–interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells. **British Journal of Cancer**, London, v. 89, p. 1130-1139, 2003.

HUANG, L.; LIAO, X.; BECKETT, M.; Li Y, KHANNA, K. K., WANG, Z., *et al.* MUC1-C Oncoprotein Interacts Directly with ATM and Promotes the DNA damage response to ionizing radiation. **Genes & Cancer**, Thousand Oaks, v. 1, n. 3, p. 239-250, 2010.

HUYN, S. T., BURTON, J. B., SATO, M., CAREY, M., GAMBHIR, S. S., WU, L. A Potent, Imaging Adenoviral Vector Driven by the Cancer-Selective Mucin-1 Promoter that Targets Breast Cancer Metastasis. **Clinical Cancer Research**, Denville, v. 15, p. 3126-3134, 2009.

JACOBS, J.J.; KIEBOOM, K.; MARINO, S.; DEPINHO, R.A.; VAN LOHUIZEN, M. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. **Nature** 397, 164-168, 1999.

JOENSUU, K.; HAGSTRÖM, J.; LEIDENIUS, M.; HAGLUND, C.; ANDERSSON L.C.; SARIOLA, H.; HEIKKILÄ, P. Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases—elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses. **Virchows Arch.** 459, 31-39, 2011.

JORDAN, C.T.; GUZMAN, M.L.; NOBLE, M. Mechanisms of the disease: **Cancer Stem Cells**. *N Engl J Med*; 355:1253-61, 2006.

KAELIN, W.G.J. The emerging p53 gene family. **J Natl Cancer Inst**; 91:594-598, 1999.

KAMIJO, T.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M.F.; QUELLE, D.E.; DOWNING, J.R.; ASHMUN, R.A.; GROSVELD, G.; SHERR, C.J. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. **Cell** 91, 649-659, 1997.

KIM, J.H.; YOON, S.Y.; JEONG, S.H.; KIM, S.Y.; MOON, S.K.; JOO, J.H.; LEE, Y.; CHOE, I.S.; KIM, J.W. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer. **Breast** 13(5):383–388, 2004.

KIM, C. F.; JACKSON, E. L.; WOOLFENDEN, A. E.; LAWRENCE, S.; BABAR, I.; VOGEL, S.; CROWLEY, D.; BRONSON, R. T.; JACKS, T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. **Cell**, 121, 823-835, 2005.

KIM, H. J.; KIM, J. B.; LEE, K. M.; SHIN, I.; HAN, W.; KO, E.; BAE, J. Y.; NOH, D. Y. Isolation of CD24(high) and CD24(low/-) cells from MCF-7: CD24 expression is positively related with proliferation, adhesion and invasion in MCF-7. **Cancer Lett** 258:98–108, 2007.

KLEINSMITH, L. J.; PIERCE, G.B. Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. **Cancer Res.** 24, 1544-1551, 1964.

KLOPFLEISCH, R.; LENZE, D.; HUMMEL, M.; GRUBER, A.D. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. **BMC Cancer**, v.10, p.618, 2010.

KRISTIANSEN, G.; SCHLÜNS, K.; YONGWEI, Y.; DIETEL, M.; PETERSEN, I. CD10 expression in non-small cell lung cancer. **Anal Cell Pathol.** v.24, p.41-6, 2002.

KRIVTSOV, A. V.; TWOMEY, D.; FENG, Z.; STUBBS, M. C.; WANG, Y.; FABER, J.; LEVINE, J. E.; WANG, J.; HAHN, W. C.; GILLILAND, D. G.; GOLUB, T. R.; ARMSTRONG, S. A. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. **Nature** 442, 818-822, 2006.

LAPIDOT, T.; SIRARD, C.; VORMOOR, J.; MURDOCH, B.; HOANG, T.; CACERES-CORTES, J.; MINDEN, M.; PATERSON, B.; CALIGIURI, M. A.; DICK, J. E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature** 367, 645-648, 1994.

LEE, H. J.; CHOE, G.; JHEON, S.; SUNG, S.W.; LEE, C. T.; CHUNG, J. H. CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (Seventh) New TNM classification. **Journal of Thoracic Oncology**, vol. 5, no. 5, pp. 649–657, 2010.

LEE, C. H.; KIM, W. H.; LIM, J. H.; KANG, M. S.; KIM, D. Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **J Vet Sci**, 5:63–69, 2004.

LEVINE, P.; SIMSIR, A.; CANGIARELLA, J. Management issues in breast lesions diagnosed by fine-needle aspiration and percutaneous core breast biopsy. **American Journal of Clinical Pathology**, v.125, p.124-134, 2006.

LI, C.; HEIDT, D. G.; DALERBA, P.; BURANT, C. F.; ZHANG, L.; ADSAY, V.; WICHA, M.; CLARKE, M. F.; SIMEONE, D. M. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Res.** 67, 1030-1037, 2007.

LIM, S. C. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. **Biomed Pharmacother** 59(Suppl 2):S351–S354, 2005.

LITTLE, N.A.; JOCHEMSEN, A.G. p63. **Int J Biochem Cell Biol**; 34: 6-9, 2002.

LIU, J.H.; SONG, L.B.; ZHANG, X.; GUO, B.H.; FENG, Y.; LI, X.X.; LIAO, W.T.; ZENG, M.S.; HUANG, K.H. Bmi-1 expression predicts prognosis for patients with gastric carcinoma. **J. Surg. Oncol.** 97, 267-272, 2008.

LIU, J.; CAO, L.; CHEN, J.; SONG, S.; LEE, I.H.; QUIJANO, C.; LIU, H.; KEYVANFAR, K.; CHEN, H.; CAO, L.Y.; AHN, B.H.; KUMAR, N.G.; ROVIRA, I.I.; XU, X.L.; VAN LOHUIZEN, M.; MOTOYAMA, N.; DENG, C.X.; FINKEL, T. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. **Nature** 459, 387-392, 2009.

LIU, S.; DONTU, G.; MANTLE, I.D.; PATEL, S.; AHN, N.S. JACKSON, K.W.; SURI, P.; WICHA, M.S. Hedgehog signalling and Bmi-1 regulate selfrenewal of normal and malignant human mammary stem cells. **Cancer Res** 66(12):6063–6071, 2006.

LOAR, A.S. Tumores do sistema genital e glândulas mamárias. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3.ed. v.4. São Paulo: Ed. Manole. Cap 12, p. 1894-1906, 1992.

LOPEZ, J. I.; CAMENISCH, T. D.; STEVENS, M. V.; SANDS, B. J.; MCDONALD, J.; SCHROEDER, J. A. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. **Cancer Research**, vol. 65, no. 15, pp. 6755–6763, 2005.

LORICO, A.; RAPPA, G. Phenotypic Heterogeneity of Breast Cancer StemCells. **Journal of Oncology**, V 2011, Article ID135039, 6 pages. doi:10.1155/2011/135039

Mac EWEN, E.G.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; Mac EWEN, E.G. (Eds). **Small animal clinical oncology**. 2ed. Philadelphia W.B. Saunders, p.356-372, 1996.

MACDERMED, D. M.; KHODAREV, N. N.; PITRODA, S. P., EDWARDS, D. C., PELIZZARI, C. A., HUANG, L. MUC1-associated proliferation signature predicts outcomes in lung adenocarcinoma patients. **BMC Medical Genomics**, London, v. 3, p. 16, 2010.

MAKINO, S. Further evidence favoring the concept of the stem cell in ascites tumors of rats. **Ann. NY Acad. Sci.** 63, 818-830, 1956.

MATOS, A. J.; LOPES, C. C.; FAUSTINO, A. M.; CARVALHEIRA, J. G.; DOS SANTOS, M. S.; RUTTEMAN, G. R.; GARTNER, F. MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. **Anticancer Res**, 26:1821–1826, 2006.

MATOS, I.; DUFLOTH, R.; ALVARENGA, M.; ZEFERINO, L. C.; SCHMITT, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Arch.** 447: n 4, 688-694, 2005.

MILLS, A.A.; ZHENG, B.; WANG, X.J.; VOGEL, H.; ROOP, D.R.; BRADLEY, A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. **Nature**, 1999; 398: 708-713.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E.; LIPSCOMB, T.P.; Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2.ed. v.7. Washington: **Armed Forces Institute of Pathology**, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**, 4.ed. Ames: Iowa State Press, p. 575-606, 2002.

MORITANI, S.; KUSHIMA, R.; SUGIHARA, H.; BAMBA, M.; KOBAYASHI, T.K.; HATTORI, T. Availability of CD10 immunohistochemistry as a marker of breast myoepithelial cells on paraffin sections. **Mod Pathol.**;15(4):397–405, 2002.

NERURKAR, V. R.; CHITALE, A. R.; JALNAPURKAR, B. V.; NAIK, S. N.; LALITHA, V. S. Comparative pathology of canine mammary tumors. **J Comp Pathol**, 101: 389-397, 1989.

NIELSEN, T.O.; HSU, F.D.; JENSEN, K.; CHEANG, M.; KARACA, G.; HU, Z. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**; 10:5367–5374, 2004.

OLIVEIRA, L. R.; JEFFREY, S.; RIBEIRO-SILVA, A. Stem cells in human breast cancer. **Histology and histopathology**, v. 25, n. 3, p. 371-85, 2010.

ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44, a therapeutic target for metastasizing tumours. **Eur J Cancer** 46:1271–1277, 2010.

PAPANDREOU, C. N.; NANUS, D. M. Is methylation the key to CD10 loss? **Journal of pediatric hematology/oncology**: official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology, v. 32, n. 1, p. 2-3, 2010.

PELED, R.; CARMIL, D.; SIBONI-SAMOGA, O.; SHOHAM-VARDI, I. Breast cancer, psychological distress and life events among young women. **BMC Cancer**; 8:245, 2008.

PELLEGRINI, G.; DELLAMBRA, E.; GOLISANO, O.; MARTINELLI, E.; FANTOZZI, I.; BONDANZA, S.; PONZIN, D.; MCKEON, F.; DE LUCA, M. p63 identifies keratinocyte stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**; 98:3156-3161, 2001.

PEREIRA, L. V.; PRANKE, P. H. L.; MENDEZ-OTERO, R. Presente e Futuro das Células-Tronco. **Jornal da Ciência**, SBPC, Rio de Janeiro, 04/03/2005.<<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=25955>>. Acesso em 05-mai-2012.

PEREZ-MARTINZ, C.; GARCIA-IGLESIAS, M.J.; DURAN-NAVARRETE, A.J.; ESPINOSA-ALVAREZ, J.; GARCIA-FERNADES, R.A.; LORENZANA-ROBLES, N.; FERNANDEZ-PEREZ, S. Histopathological and immunohistochemical characteristics of two canine lipid-rich mammary carcinomas. **Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine**, v.52, n.2, p.61-66, 2005.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**; 406:747–752, 2000.

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. **J Vet Int Med**; 17: 102-106, 2003.

PHILLIPS, T. M.; MCBRIDE, W. H.; PAJONK, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 24, p. 1777-85, 2006.

PICHON, M.F.; POLLUD, C.; BRUNET, M. Relationship of presence of progesterone receptor to prognosis in early breast cancer. **Cancer Res**; 40:3357-3363, 1980.

PINOTTI, J.A. Métodos diagnósticos em mastologia – Exame clínico. **Compêndio de mastologia**. São Paulo: ed. Manole, cap. 3, p. 21-35, 1991.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4:33–45, 2003.

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

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 973-978, 2007.

PURI, V.; JAIN, M.; THOMAS, S. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinomas and its correlation with ER, PR, HER-2neu and Ki-67. **Int J of Breast Cancer**, 4 pages, 2011. doi:10.4061/2011/437957

LIU Q.; LI, J.; ZHENG, X.; JIN, F.; DONG, H. Expression of CD133, PAX2, ESA and GPR30 in invasive ductal breast carcinomas. **Chinese Medical Journal**; 122 (22): 2763-2769, 2009.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, IAN O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

RAMALHO, L. N. Z., RIBEIRO-SILVA, A., CASSALI, G. D., ZUCOLOTO, S. The Expression of p63 and Cytokeratin 5 in Mixed Tumors of the Canine Mammary Gland Provides New Insights into the Histogenesis of These Neoplasms. **Vet Pathol**, 43:424–429, 2006.

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

RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L.Z.; GARCIA, S.B.; ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. **Arch Pathol Lab Med** 127; 336-340, 2003.

SANGOI, A. R., HIGGINS, J. P., ROUSE, R. V., SCHNEIDER, A. G., MCKENNEY, J. K. Immunohistochemical comparison of MUC1, CA125, and Her2Neu in invasive micropapillary carcinoma of the urinary tract and typical invasive urothelial carcinoma with retraction artifact. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 22, p. 660-667, 2009.

SASSI, F.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; SARLI, G. Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BMC Veterinary Research**, v.6, p.5, 2010.

SCHMITT, F.C.; BENTO, M.J.; AMENDOEIRA, I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. **Diagn. Cytopathol.**, 13(4): 347-51, 1995.

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

SIGNORETTI, S.; WALTREGNY, D.; DILKS, J.; ISAAC, B.; LIN, D.; GARRAWAY, L.; YANG, A.; MONTIRONI, R.; MCKEON, F.; LODA, M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. **Am J Pathol**; 157: 1764-1775, 2000.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**; 34(2): 625, 2004.

SMOLLIICH, M.; GÖTTE, M.; YIP, G.W.; YONG, E.S.; KERSTING, C.; FISCHGRÄBE, J.; RADKE, I.; KIESEL, L.; WÜLFING, P. On the role of endothelinconverting enzyme-1 (ECE-1) and eprilysin in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**;106:361-9, 2007.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 98:10859–10874, 2001.

SORLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A., *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 100:8418–8423, 2003.

SPIZZO, G.; WENT, P.; DIRNHOFER, S.; OBRIST, P.; SIMON, R.; SPICHTIN, H. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**; 86: 207-213, 2004.

STINGL, J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. **Journal of Pathology**, n. October 2008, p. 229- 241, 2009.

TSE, G. M. K.; TSANG, A K. H.; PUTTI, T. C. Stromal CD10 expression in mammary fibroadenomas and phyllodes tumours. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 2, p. 185-9, 2005.

TSUDA, H. HER-2 (c-erbB-2) Test Update: Present Status and Problems. **Breast Cancer**; 13(3): 236-248, 2006.

VALE, F. R. Fatores reguladores da angiogênese e infiltração tumoral nos carcinomas mamários positivos para a citoqueratina 5. [dissertação]. Ribeirão Preto: **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** (FMRP); 2006.

VAN DER LUGT, N.M.; DOMEN, J.; LINDERS, K.; VAN ROON, M.; ROBANUS-MAANDAG, E.; TE RIELE, H.; VAN DER VALK, M.; DESCHAMPS, J.; SOFRONIEW, M.; VAN LOHUIZEN, M. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the Bmi-1 proto-oncogene. **Genes Dev.** 8, 757-769, 1994.

VRZALIKOVA, K.; SKARDA, J.; EHRMANN, J.; MURRAY, P.G.; FRIDMAN, E.; KOPOLOVIC, J.; KNIZETOVA, P.; HAJDUCH, M.; KLEIN, J.; KOLEK, V.; RADOVA, L.; KOLAR, Z. Prognostic value of Bmi-1 oncoprotein in NSCLC patients: a tissue microarray study. **J Cancer Res Clin Oncol** 134(9):1037–1042, 2008.

WAGONER, J.; KEEHN, C.; MORGAN, M.B. CD-10 immunostaining differentiates superficial basal cell carcinoma from cutaneous squamous cell carcinoma. **The American Journal of dermatopathology**, v. 29, n. 6, p. 555-8, 2007.

WANG, H.; PAN, K.; ZHANG, H.K.; WENG, D.S.; ZHOU, J.; LI, J.J.; HUANG, W.; SONG, H.F.; CHEN, M.S.; XIA, J. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, 134(5):535–541, 2008.

WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer stem cells: an old idea - a paradigm shift. **Cancer Res.** 66, 1883-1890, 2006.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLET, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCHE, V., p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing and dominant-negative activities. **Mol Cells**; 2: 305-316, 1998.

YANG, A.; SCHWEITZER, R.; SUN, D.; KAGHAD, M.; WALKER, N.; BRONSON, R.T., *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature**; 398: 714-718, 1999.

YANG, A.; MC KEON, F.: p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**; 1: 194-207, 2000.

YANG, D. S.; PARK, K. H.; WOO, O. H.; KIM, A. R., LEE, E. S., LEE, J. B. Association of a vascular endothelial growth factor gene 936 C/T polymorphism with breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, Boston, v.125, n. 3, p.849-853, 2010.

YIN, L.; LI, Y.; REN, J.; KUWAHARA, H.; KUFÉ, D. Human MUC1 Carcinoma Antigen Regulates Intracellular Oxidant Levels and the Apoptotic Response to Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 37, p. 35458-35464, 2003.

ZAIDAN DAGLI, M. L. The search for suitable prognostic markers for canine mammary tumors: a promising outlook. **Vet J**, 177:3–5, 2008.

ZHENG, J.; LI, Y.; YANG, J.; LIU, Q.; SHI, M.; ZHANG, R.; SHI, H.; REN, Q.; MA, J.; GUO, H.; TAO, Y.; XUE, Y.; JIANG, N.; YAO, L.; LIU, W. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. **BMC Cancer**, vol. 11, article 251, 2011.

ZUCCARI, D.A.P. C.; PAVAM, M.V.; CORDEIRO, J. A.; SANTANA, A. E. A imuno-expressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. **RPCV**; 99 (551): 173-178, 2004.

Artigo Científico

Artigo enviado à revista OPEN JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE

Authors' Guidelines

General Information

Open Journal of Veterinary Medicine (OJVM) is an international peer-reviewed, open access journal publishing in English original research studies, reviews and case reports in all aspects of Veterinary Medicine. Symposia or workshop papers may be published as supplements.

The submitted manuscript should not have been previously published in any form and must not be currently under consideration for publication elsewhere.

Manuscript Preparation

To expedite the review process, please format the manuscript in ways as follows:

1. Prepare your manuscript as a single PDF or MS Word document. The file should include the complete text, references, tables and figures. Any revised manuscripts prepared for publication should be sent as a single editable Word document. LaTeX paper is also acceptable for publication, but it should be in PDF for review first.
2. Manuscripts should be written in English and include a 100-300 word abstract.
3. Make sure all the characters in the text, tables, figure legends, footnotes and references are in a single typeface and point size – such as 12 pt Times New Roman. Once a manuscript is accepted, a copy editor will decide the typeface and size of the different elements of the article.
4. Submit all figures or photographs as jpg or tif files with distinct characters and symbols at 500 dpi (dots per inch). Tables and equations should be in an editable rather than image version. Tables must be edited with Word. Equations must be edited with Equation Editor.
5. Type your manuscript single spaced. This will save pages, makes it easier for reviewers to handle and helps slow down global warming by using less paper.
6. All references should be numbered in square brackets in the text and listed in the REFERENCES section in the order they appear in the text, as shown below:

Journal Articles: [1] E. Y.-K. Ng, W. K. Ng and S. Y. Liu, “Heat Source Analysis of Hard Disk Drives with Different Wall Conditions Using Infrared System,” Engineering, Vol. 3, No. 1, 2011, pp. 22-31.

E-Journal Articles: [2] F. Manzano, V. Corchete, M. Chourak and G. Manzano, "Determination of a Gravimetric Geoid Solution for Andalusia (South Spain)," Engineering, Vol. 2, No. 3, 2010, pp. 160-165. http://www.scirp.org/fileOperation/download.aspx?path=Engineering20100300003_65644459.pdf&type=journal

Books:[3] S. Verdu, "Multi-User Detection," Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

Edited Book: [4] A. S. Prasad, "Clinical and Biochemical Spectrum of Zinc Deficiency in Human Subjects," In: A. S. Prasad, Ed., Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements, Alan R. Liss, Inc., New York, 1982, pp. 5-15.

Conference Proceedings: [5] T. Hu and J. P. Desai, "Soft-Tissue Material Properties under Large Deformation: Strain Rate Effect," Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS, San Francisco, 1-5 September 2004, pp. 2758-2761.

Thesis:

[6] W. Heinzelman, "Application-Specific Protocol Architectures for Wireless Networks," Ph.D. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, 2000.

Internet: [7] L. Honeycutt, "Communication and Design Course," 1998. <http://dcr.rpi.edu/commdesign/class1.html>

Online Submission

Manuscripts should be submitted online via the **Open Journal of Veterinary Medicine (OJVM)** online manuscript submission and review system at: <http://papersubmission.scirp.org/admin/initLoginAction.action?journalID=195>

Authors are invited to provide the names of three well qualified reviewers. Current e-mail addresses must be provided for all suggested reviewers.

An author declaration form should be signed by all authors. A template for this form is included at the end of this document.

A copyright transfer agreement should be signed after the acceptance for publication.

Immunoexpression of Cathepsin D and S100A4 protein and their molecular subtypes in canine mammary carcinomas

Fernanda C. Figueiroa¹, Breno S. Salgado¹, Lidianne N. Monteiro¹, Rafael Malagoli Rocha², Maria Aparecida C. Domingues¹, Diana Martins³, Fernando Schmitt^{3,5}, Noeme S. Rocha^{1,4}

¹*Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Brazil;*

²*Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente. São Paulo, Brazil;*

³*Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto – IPATIMUP. Oporto, Portugal.*

⁴*Departamento de Clínica Veterinária, Serviço de Patologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, Brazil;*

⁵*Faculdade de Medicina – Universidade do Porto. Oporto, Portugal.*

E-mail: rochanoeme@fmvz.unesp.br

Abstract

Cathepsin D (CD), a lysosomal protease, and S100A4 protein, a calcium binding motif, are considered to be involved in metastasis in various human cancers. No data regarding such proteins are available for canine mammary carcinomas (CMCs). Accordingly, their expression in association with known factors of prognosis was investigated in this study. For that, 66 surgically resected CMCs were submitted to an immunohistochemical evaluation using anti CD, S100A4 protein, HER2, estrogen receptor α , cytokeratin 5, and p63 antibodies, further characterizing the tumors' molecular subtype. An increase in S100A4 immunoexpression by neoplastic luminal mammary cells was associated with an infiltrative tumor mode of growth, consequently leading us to conclude that S100A4 protein could be related to progression in CMCs. Additionally, the occurrence of the luminal A molecular subtype was associated with the complex histotype in CMCs. Although we have demonstrated that changes in S100A4 protein immunoexpression occurs in CMCs, further studies are needed to determine whether this represents important independent biomarkers for CMCs.

Keywords: Cathepsin; mammary tumors; metastasis-associated proteins; molecular subtypes; S100 protein.

1. Introduction

Mammary gland tumors are the most common neoplasms of the female dog and represent a remarkably heterogeneous group in terms of morphology and biological behavior.¹ Consequently, the identification of reliable prognostic factors is very important in order to assess the individual

risk and evaluate the clinical outcome. The prognosis of advanced mammary carcinoma patients is most likely related to the degree of metastatic spread. Although the process of cancer metastasis appears to be regulated by a variety of gene products, little is known about the molecular aspects of progression of canine mammary carcinoma (CMC) cells.

Despite this, specific proteins such as Cathepsin D (CD)² and S100A4 protein³ revealed to be important to the metastatic process of breast cancer in humans, consequently being classified as metastasis-related proteins.

CD is a well characterized lysosomal hydrolase, serving critical functions in intracellular protein degradation and in the breakdown of the extracellular matrix.⁴ It was also demonstrated that CD is important for fibroblast invasive outgrowth and could act as paracrine mediator between cancer and stromal cells.⁵ In humans, such protein is aberrantly overproduced and hypersecreted by both neoplastic and nonneoplastic cells from the tumor microenvironment, such as macrophages and fibroblasts.⁵ Intracellular CD in human breast cancer cells has been shown to have 8-16 times more activity than normal mammary cells.⁶

On the other hand, the S100A4 protein belongs to a calcium-dependent family of proteins whose expression is elevated in several pathological conditions. Furthermore, it is already well documented that S100A4 is expressed in malignant neoplastic cells of humans and contributes to the motility of tumor cells and the consequent metastatic progression, although this mechanism has not yet been elucidated.⁷ Some authors reported that the overexpression of the S100A4 protein is closely related to many functions that collaborate in the aggressiveness of the tumor such as metastases to the lymph nodes.⁸

Since there are no studies regarding the immunoexpression of such proteins in CMCs, the aim of the present study is to immunohistochemically characterize the expression patterns of Cathepsin D and the S100A4 protein in canine mammary tumors and relate such patterns with histopathological characteristics and HER2 and estrogen receptor- α status related immunophenotypic subtypes

(luminal-like, basal-like, and HER2 overexpression).

2. Materials and Methods

2.1. Tissue samples and histological evaluation

Sixty six surgically resected CMC tissue specimens were obtained from female dogs which underwent mastectomy at the São Paulo State University's Veterinary Hospital, Botucatu, Brazil, between March 2002 and September 2006. All patients had the tumor specimens surgically removed by radical mastectomy and none of them had received preoperative chemotherapy or radiotherapy. Tissue samples from these neoplasms were fixed in 10% neutral buffered formalin, routinely processed, and paraffin-embedded. For routine microscopic examination, 4 μ m thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin with subsequent evaluation under light microscopy. Lesions were classified according to standard diagnostic criteria provided by the World Health Organization⁹ which are propagated throughout more recent classification schemes^{10,11} and subsequently grouped in two subgroups: simple neoplasms (when the neoplasm was composed of a single cell type – luminal mammary cells) and complex neoplasms (when the neoplasm was composed of luminal mammary cells and myoepithelial cells). Histopathological parameters (vascular invasion, mode of growth, and presence of intratumoral necrotic tissue) were also evaluated. Then, representative areas of donor paraffin blocks were obtained in order to construct tissue microarrays (TMA). For that, a TMA workstation (TMA builder, Histopathology Inc., Hungary) was used to obtain tissue cores from the donor blocks which were subsequently transferred to recipient paraffin blocks. A total of seven recipient blocks were constructed, each one containing 24

tissue cores arranged in a 4 x 6 sector. Subsequently, 4 µm thick sections were obtained from the recipient blocks in order to review if morphologically representative areas of the original lesions from the donor blocks were present.

2.2. Immunohistochemistry

Firstly, 3 µm thick histologic sections were obtained from TMA recipient blocks and transferred to glass slides previously embedded in an adhesion medium. Such slides were subsequently deparaffinized, and rehydrated. The used primary antibodies and antigen retrieval methods for each antibody are summarized in table 1. Antigen retrieval was performed using 10 mM sodium citrate buffer at pH 6.0 for all antibodies. Antigen-antibody reaction for all antibodies was detected using the streptavidin-biotin-peroxidase complex method using the Dako LSAB kit (Dako, Carpinteria, USA) except for estrogen receptor alpha, for which antigen-antibody reaction was detected using a polymer-based labeling detection system (Novolink Polymer Detection System, Novocastra, Newcastle, UK).

After cooling (20 minutes at room temperature), the sections were immersed for 30 minutes in a solution of 3% hydrogen peroxide diluted in methanol in order to block endogenous peroxidase activity. All slides were incubated with a

protein block reagent (LabVision, Freemont, CA) for 10 minutes and subsequently overnight incubated at 4 °C with the specific primary antibodies. Then, the slides were immersed with the detection systems following the manufacturer's instructions. Subsequently, 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride was used as chromogen in order to allow the visualization of antigen-antibody reaction. Then, the slides were counterstained using Harris's hematoxylin, dehydrated, and mounted for evaluation at light microscopy. As positive controls for Cathepsin D and S1004, both canine and human skin containing fibroblasts and tonsils were used, respectively. Immunoreaction with canine tissue for both antibodies was stated by manufacturers and confirmed by positive controls. Adjacent normal non-lactating mammary tissues were used as internal positive controls for CK5 (basal cells are stained), Cathepsin D and p63 protein (myoepithelial cells are stained). As positive controls, we also used canine uterus sections for ERα and a canine mammary carcinoma previously characterized as positive for HER2. Negative controls were carried out by using pre-immune rabbit or mouse IgG (Dako, Carpinteria, CA) as primary antibodies.

Table 1. Antibodies used in the immunohistochemical study

Antibody	Dilution	Origin	Clone	Source	Pre-treatment
c-erbB2 (HER2)	1:80	Neomarkers, UK	SP3	Rabbit	Microwave
Erα	1:40	Novocastra, UK	NCL-LH2	Mouse	Microwave
p63	1:150	Neomarkers, USA	4A4	Mouse	Microwave
CK5	1:50	Neomarkers, USA	XM26	Mouse	Microwave
Cathepsin D	1:300	Dako, USA	Polyclonal	Rabbit	No antigen retrieval
S100A4	1:1500	Abcam, UK	Polyclonal	Rabbit	Microwave

2.3. Evaluation of immunohistochemical staining

For assessing immunohistochemistry results, tumors were considered as positive when more than 10% of neoplastic cells revealed nuclear staining (p63,^{12,13} S100A4, and ER¹³) and of cytoplasmic staining (Cathepsin D² and cytokeratin 5¹³). Although there are no absolute criteria for the immunopositivity of each antibody used in this study, 10% of tumour cells as criterion for positivity gave us a good result in previous experiments analyzing keratin genes and tumour-associated genes. Therefore, immunohistochemistry results were considered to be positive when >10% of tumour cells were immunoreactive. Such information was included in the manuscript's 'materials and methods' along with the references

For assessing HER2 status, the HercepTest scoring system (Dako, Carpinteria, CA) was applied (0= no membrane staining or <10% of stained cells; 1+=incomplete membrane staining in >10% of cells; 2+= >10% of cells with weak to moderate complete membrane staining; and 3+= strong and complete membrane staining in >10% of cells), with 2+ and 3+ cases considered as positive.

2.4. Classification into immunophenotypic subtypes

According to the classification proposed for humans¹⁴ and already utilized in CMCs¹³, the tumors in the present study were classified into four distinct subtypes: luminal-like (A= ER-positive and HER-2-negative; B= positive for ER and HER-2), basal-like (negative for ER and HER-2 and positive for P63 and/or CK5), and HER-2 overexpression (negative for ER and positive for HER-2). The subgroups were also compared with CD and S100A4 protein immunoexpression.

2.5. Statistical analysis

Differences were compared using the chi-square test and statistical significance was accepted at the $P < 0.05$ level. Analyses were performed using the GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3. Results

Of the 66 tumors analyzed, 21 (31.82%) were simple carcinoma and 45 (68.18%) were of the complex carcinoma type. It was possible to immunohistochemically identify the proteins CD, S100A4, ER, HER-2, p63, and CK5. The immunostaining for cathepsin D (Figure 1) and the S100A4 protein (Figure 2) was considered as positive in 59 (89.4%) and 16 (24.24%) tumors, respectively. No association between CD and S100A4 protein was observed.

When evaluating histopathological parameters, the invasive mode of growth was found to be significantly related to positive nuclear immunoexpression of S100A4 protein ($P = 0.0439$). For CD, although in our study many cases in which the invasive mode of growth was observed revealed positive cytoplasmic immunoexpression, a statistical significant correlation was not evident. Additionally, no relation between CD or the S100A4 protein and presence of intratumoral necrosis and vascular invasion was stated.

The 66 mammary tumors were divided into distinct subtypes based on the results of immunohistochemical staining for HER2, ER α , p63, and CK5, as described in Table 2. The Luminal A subtype included 24 (36.36%) tumors, and a statistically significant association between this subtype and complex mammary tumors was stated ($P = 0.001496$). Six tumors (9.09%) were characterized as Luminal B. Twenty five tumors (37.88%) were considered to be basal-like neoplasms, and eight (12.12%)

tumors revealed HER-2 overexpression. Three tumors (4.54%) fell outside of definitions of the four subtypes proposed since they did not revealed positive immunoexpression of p63 or CK5 in absence of HER2 and ER α . No other significant relations between histotypes and the molecular subtypes were observed, and no relation between the subtypes and CD and/or S100A4 protein immunoexpression was stated. Results regarding the immunoexpression of Cathepsin D and S100A4 in the different immunophenotypic subtypes are summarized in table 2.

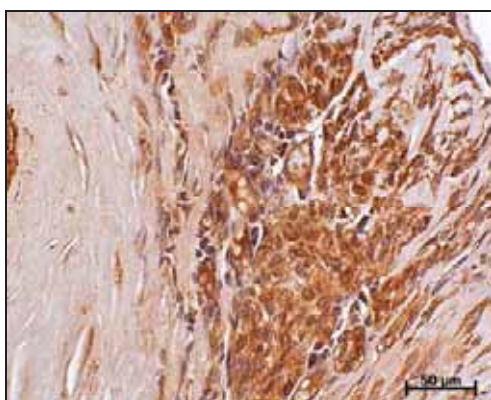


Figure 1. Cathepsin D immunoexpression in a canine mammary complex carcinoma case. Cytoplasmic immunoexpression can be observed in luminal mammary neoplastic cell clusters. DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 50 μ m).

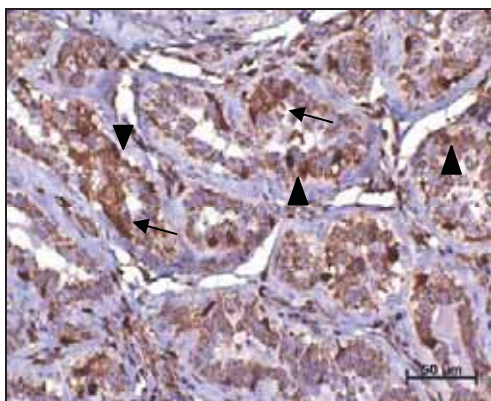


Figure 2. S100A4 immunoexpression in a canine mammary carcinoma case. Nuclear and more often cytoplasmic immunoexpression can be observed in a luminal mammary neoplastic cell cluster (arrows) and in mammary myoepithelial cells around ducts (arrowheads). DAB immunohistochemistry. Harris hematoxylin counterstain (bar = 50 μ m).

4. Discussion

Metastasis is a major event associated with malignancies. This complex process initiates when neoplastic cells lose the expression of proteins responsible for cell adhesion and cell-extracellular matrix interaction, invade the surrounding tissue and realize intravasation.¹⁵ Many proteins are said to be involved in such cascade of events, and CD² and the S100A4 protein³ emerge as useful biomarkers in various human cancers. However, no studies regarding the immunoexpression of such proteins were performed until the present date in canine mammary carcinomas.

The role of CD in breast cancer is not well defined, and there are controversial studies on it in human medicine.² This dispute originates from studies using either immunohistochemistry or Western blotting techniques.¹⁶⁻²³ Some authors reported that immunohistochemically assessed CD in tumor cells was associated with a favorable prognosis in node positive patients.¹⁶ In contrast, other authors showed that neoplastic cell-associated CD expression was associated with a poor prognosis.¹⁹ However, in none of these studies CD was considered to be an independent prognostic variable. In our study CD immunoexpression was characteristic and very intense in neoplastic cells, particularly in luminal mammary cells. Despite this, our results failed to considerate CD as an independent biomarker, in contrast to results described in humans.¹⁹

In the present study we also have demonstrated the nuclear immunoexpression of S100A4 protein in luminal cells of canine mammary carcinoma samples. The role of S100A4 protein in metastasis is unclear at present in canine mammary carcinomas. This is the first report that has studied the expression of S100A4 protein in a series of such tumors. It has been reported that S100A4 may affect the function of cytoskeleton proteins including actin and

non muscle myosin.²⁴⁻²⁵ It is possible that S100A4 may regulate cell shape changes and/or cell motility, features associated with neoplastic progression. Many in vitro and in vivo studies in rodents have provided evidence that S100A4 is directly involved in neoplastic progression and metastasis.^{26,27} In our study, the S100A4 protein revealed to be significantly related to the infiltrative tumor mode of growth, suggesting a role in neoplastic progression also in canine mammary tumors.

In this study, tumors were characterized into five subtypes similar to those described in humans, and the results were compared with the immunoexpression of CD and S100A4 protein. Such subtypes are based in human breast tumors studies which identified distinct molecular types according to their gene expression profile, pathobiology and clinical evolution.^{14,28,29} Some authors applied this classification into canine mammary tumors, revealing that such molecular

subtypes can also be immunohistochemically recognized in canines.^{14,30}

When solely analyzing the immunophenotypic subtypes, a statistical difference in the Luminal A subtype was highlighted, more frequently associated with complex carcinomas and thus corroborating other authors' findings.¹⁴ Despite the lack of a significant difference, the majority of tumors (37.88%) were classified as basal. Several studies have demonstrated that human breast carcinomas with a basal subtype present molecular, histological and behavioral characteristics that indicate an unfavorable prognosis,³¹ principally on account of not possessing known therapeutic targets. This higher basal subtype frequency in canine female mammary carcinomas may qualify them as a suitable experimental model for the basal subtype in women breast cancer.¹⁴

Table 2. Molecular subtypes according to histological type, histological parameters of malignancy, and immunoexpression of Cathepsin D and S100A4 protein

	Luminal A n (%)	Luminal B n (%)	Basal- like n (%)	HER-2 overexpressi on n (%)	Unclassi -fied^f	Total n (%)
Type						
Simple	6 (25%)	1 (16.66%)	9 (36%)	3 (37.5%)	2	21 (31.81%)
Complex	18 (75%)	5 (83.33%)	16 (64%)	5 (62.5%)	1	45 (68.18%)
<i>P</i> value	0.001496*	0.08326	0.08969	0.6171	-	-
Vascular Invasion						
Present	2 (8.33%)	0	1 (4%)	0	1	4 (6.06%)
Absent	22 (91.66%)	6 (100%)	24 (96%)	8 (100%)	2	62 (93.93%)
Mode of growth						
Expansive	17 (68%)	5 (83.33%)	18 (72%)	7 (87.5%)	2	49 (74.24%)
Invasive	7 (32%)	1 (16.66%)	7 (28%)	1 (12.5%)	1	17 (25.75%)
Presence of Necrosis						
Present	7 (32%)	0	7	0	1	15 (22.72%)
Absent	17 (68%)	6 (100%)	18	8 (100%)	2	51 (77.27%)
Cathepsin D						
Negative	4 (16.66%)	0	2 (8%)	0	1	7 (10.6%)
Positive	20 (83.33%)	6 (100%)	23 (92%)	8 (100%)	2	59 (89.4%)
S100A4						
Negative	19 (79.17%)	4 (66.66%)	18 (72%)	7 (87.5%)	2	50 (75.75%)
Positive	5 (20.83%)	2 (33.33%)	7 (28%)	1 (12.5%)	1	16 (24.24%)

**P* < 0.05 ^fTumors negative for CK5 and p63 in absence of HER2 and ERα positive immunoreactions

5. Conclusion

In our study S100A4 was significantly related to an infiltrative mode of tumor growth, consequently demonstrating to be an interesting biomarker for evaluation of neoplastic progression in CMCs. Although we have demonstrated that alteration in CD and S100A4 protein immunoexpression occurs in CMCs, further studies are needed to determine whether this represents important independent biomarkers for such tumors. Additionally, it was possible to conclude that Luminal A mammary tumors are associated with the complex histotype in CMCs.

6. Acknowledgements

N. S. R thanks the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support through the research grants 2008/57309-5 and 2010/51596-2.

REFERENCES

- [1] V.R. Nerurkar, A.R. Chitale, B.V. Jalnapurkar, S.N. Naik, V.S. Lalitha, "Comparative pathology of canine mammary tumors." *Journal of Comparative Pathology* 1989; Vol.101; pp. 388-397.
- [2] M.C. Ramirez-Ortega, M. Frias-Mendivil, R. Delgado-Chavez, A. Menese-Garcia, J.F. Carrillo-Hernandez, M.T. Ramirez-Ugalde, I. Zeichner-Gancz, "Expresión de catepsina D en carcinoma mamário y SUS correlaciones clinicas e histopatológicas." *Revista de Investigación Clínica* 1997; Vol. 49; pp.361-368.
- [3] L. Mazzucchelli, "Protein S100A4: too long overlooked by pathologists?" *American Journal of Pathology* 2002; Vol.160; pp.7-13.
- [4] E. Barthell, I. Mylonas, N. Shabani, S. Kunze, C. Kuhn, U. Jeschke, K. Friese, "Immunohistochemical visualization of Cathepsin-D expression in breast cancer." *Anticancer Research* 2007; Vol. 27; pp. 2035-2040.
- [5] E. Liaudet-Coopman, M. Beaujoin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondul-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prebois, H. Rochefort, F. Vignon, "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis." *Cancer Letters* 2006; Vol. 237; pp. 167-179.
- [6] F. Capony, C. Rougeot, P. Montcourrier, V. Cavailles, G. Salazar, H. Rochefort, "Increased secretion, altered processing and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells." *Cancer Research* 1989; Vol 49; pp. 3904-3909.
- [7] S. Tarabykina, T.R. Griffiths, E. Tulchinsky, J.K. Mellon, I.B. Bronstein, M. Kriajevska, "Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration." *Current Cancer Drug Targets* 2007; Vol 7; pp. 217-228.
- [8] Y.G. Cho, S.W. Nam, T.Y. Kim, Y.S. Kim, C.J. Kim, J.Y. Park, J.H. Lee, H.S. Kim, J.W. Lee, C.H. Park, Y.H. Song, S.H. Lee, N.J. Yoo, J.Y. Lee, W.S. Park, "Overexpression of S100A4 is closely related to the aggressiveness of gastric cancer." *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2003; Vol. 111; pp. 539-545.
- [9] W. Misdorp, R.W. Else, E. Hellmén, T.P. Lipscomb, "Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat", 2nd ed.,

- Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1999.
- [10] M. Goldschmidt, L. Peña, R. Rasotto, V. Zapulli, "Classification and grading of canine mammary tumors." *Veterinary Pathology* 2011; Vol. 48; pp. 117-131.
- [11] G.D. Cassali, G.E. Lavallo, A.B. De Nardi, E. Ferreira, A.C. Bertagnolli, A. Estrela-Lima, A.C. Alessi, C.R. Daleck, B.S. Salgado, C.G. Fernandes, R.A. Sobral, R.L. Amorim, C.O. Gama, K.A. Damasceno, P.A. Auler, G.M. Magalhães, J.O. Silva, J.B. Raposo, A.M.R. Ferreira, L.O. Oliveira, C. Malm, D.A.P.C. Zuccari, N.M. Tanaka, L.R. Ribeiro, L.C. Campos, C.M. Souza, J.S. Leite, L.M.C. Soares, M.F. Cavalcanti, Z.G.C. Fonteles, I.D. Schuch, J. Paniago, T.S. Oliveira, E.M. Terra, T.L.L. Castanheira, A.O.C. Felix, G.D. Carvalho, T.N. Guim, E. Garrido, S.C. Fernandes, F.C.L. Maia, M.L.Z. Dagli, N.S. Rocha, H. Fukumasu, F. Grandi, J.P. Machado, M.M.S. Silva, J.E. Bezerril, M.S. Frehse, E.C.P. Almeida, C.B. Campos, "Consensus for the diagnosis, prognosis, and treatment of canine mammary tumors." *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 2011; Vol 4; pp. 153-180.
- [12] L.N.Z. Ramalho, A. Ribeiro-Silva, G.D. Cassali, S. Zucoloto, "The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms." *Veterinary Pathology* 2006; Vol. 43; pp. 424-429.
- [13] A. Gama, A. Alves, F. Schmitt, "Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification." *Virchows Archive* 2008; Vol 453; pp. 123-132.
- [14] C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, "Molecular portraits of human breast tumors." *Nature* 2000; Vol. 406; pp. 747-752.
- [15] A.F. Chambers, A.C. Groom, I.C. MacDonald, "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." *Nature Reviews Cancer* 2002; Vol 2; pp. 563-572.
- [16] J.A. Henry, A.L. McCarthy, B. Angus, B.R. Westley, F.E.B. May, S. Nicholson, J. Cairns, A.L. Harris, C.H.W. Horne, "Prognostic significance of the estrogen regulated protein, cathepsin D, in breast cancer." *Cancer* 1990; Vol. 65; pp. 265-271.
- [17] A.K. Tandon, G.M. Clark, G.C. Chamness, J.M. Chirgwin, W.L. McGuire. "Cathepsin D and prognosis in breast cancer." *New England Journal of Medicine* 1990; Vol. 332; pp. 297-302.
- [18] W. Domagala, G. Striker, A. Szadowska, A. Dukowicz, K. Weber, M. Osborn. "Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry: no correlations with survival at 5 years." *American Journal of Pathology* 1992; Vol. 141; pp. 1003-1012.
- [19] J. Isola, S. Weitz, T. Visakorpi, K. Holli, R. Shea, N. Khabbaz, O.P. Kallioniemi, "Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer." *Journal of Clinical Oncology* 1993; Vol. 11; pp. 36-43.
- [20] P. Ravdin, "Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 1993; Vol. 24; pp. 219-226.
- [21] P.M. Ravdin, A.K. Tandon, C.D.C. Allred, G.M. Clark, S.A.W. Fuqua, S.H. Hilsenbeck, G.C. Chamness, C.K. Osborne, "Cathepsin D by

- Western blotting and immunohistochemistry: failure to confirm correlations with prognosis in node negative breast cancer.” *Journal of Clinical Oncology* 1994; Vol. 12; pp. 467-474.
- [22] R.D. Cardiff, “Cathepsin D and breast cancer: useful?” *Human Pathology* 1994; Vol. 25; pp. 847-848.
- [23] H. Rochefort, “The prognostic value of cathepsin D in breast cancer. A long road to the clinic.” *European Journal of Cancer* 1996; Vol. 32A; pp. 7-8.
- [24] B.R. Davies, M.P.A. Davies, F.E.M. Gibbs, R. Barraclough, P.S. Rudland, “Induction of the metastatic phenotype by transfection of a benign rat mammary epithelial cell line with the gene for p9ka, a rat calcium-binding protein, but not with the oncogene EJ-ras-1.” *Oncogene* 1993; Vol. 8; pp. 999-1008.
- [25] M. Krijavetska, M.N. Cardenas, M.S. Grigorian, N.S. Ambartsumain, G.P. Georgiev, E.M. Lukanidin, “Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis related mts-1 gene.” *Journal of Biological Chemistry* 1994. Vol. 269; pp. 19679-19682.
- [26] D.M. Helfman, E.J. Kim, E. Lukanidin, M. Grigorian, “The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.” *British Journal of Cancer* 2005; Vol. 92; pp. 1955-1958.
- [27] S.C. Garret, K.M. Varney, D.J. Weber, A.R. Bresnick, “S100A4, a mediator of metastasis.” *Journal of Biological Chemistry* 2006; Vol. 281; pp. 677-680.
- [28] T. Sorlie, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. Van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P. Eystein-Lonning, A.L. Borresen-Dale, “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001; Vol. 98; pp. 10859-10874.
- [29] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C.M. Perou, P.E. Lonning, P.O. Brown, A.L. Borresen-Dale, D. Botstein, “Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2003; Vol. 100; pp. 8418-8423.
- [30] A. Gama, A. Alves, F. Schmitt, “Expression and significance of CK19 in canine malignant mammary tumours.” *Veterinary Journal* 2010; Vol. 184; pp. 45-51.
- [31] B. Sousa, J. Paredes, F. Milanezi, N. Lopes, D. Martins, R. Dufloth, D. Vieira, A. Albergaria, L. Veronese, V. Carneiro, S. Carvalho, J.L. Costa, L. Zeferino, F. Schmitt, “P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study.” *Histology and Histopathology* 2010; Vol. 25; pp. 963-974

Anexos

Anexo I - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



A T E S T A D O

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto **"Expressão de marcadores de células-tronco em carcinoma espontâneo de mama em cadelas e sua correlação com o grau de agressividade nos diferentes subtipos de tumores"**, Protocolo nº 135/2009-CEUA, do aluno(a) **Fernanda Carmello Figueiroa**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 29 de setembro de 2009.

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu



FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica

Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000

☎ fax: 14-3811-6105 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br



Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**FMVZ-UNESP****FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU****SERVIÇO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**CEP 18.618-970 – Cx Postal 585 – Botucatu - SP - Rubião Jr. – FONE/ FAX (14) 38116293

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informo que estou de acordo, consciente e perfeitamente esclarecido que será realizada coleta do tumor de mama da cadela: _____, idade: _____, peso: _____, raça: _____, pelagem: _____ RG/FMVZ-UNESP-Botucatu: _____, de minha propriedade, para a realização de exame histopatológico e imunoistoquímico para fins de pesquisa no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Botucatu e posteriormente os resultados serão publicados em revistas especializadas nesse assunto.

Proprietário (a): _____

RG: _____

CPF: _____

Assinatura: _____

Botucatu, ____ de _____ de 20__.