

ANÁLISE DAS CÉLULAS TRONCO TUMORAIS EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CÃES*

Gabriela Mayumi Gouveia¹⁺, Milla Bezerra Paiva¹, Silvia Helena Venturoli Perri²
e Maria Cecília Rui Luvizotto³

ABSTRACT. Gouveia G.M., Paiva M.B., Perri S.H.V. & Luvizotto M.C.R. [Analysis of cancer stem cells in dog's mammary neoplasias]. Análise das células tronco tumorais em neoplasias mamárias de cães. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(3):229-235, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Departamento de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, *Campus* Unesp-Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil. E-mail: gradpos@fmva.unesp.br

Mammary tumors are the most frequent cancers in dogs, representing about 50% of tumors, and have a higher incidence in females of middle aged and elderly. These tumors have been used as a model for breast cancer in women due to several common characteristics such as histological and immunohistochemical similarities. In the last decade, studies based on molecular profiles of breast cancer, made possible the identification of some neoplastic cells with characteristics of stem cells - cancer stem cells (CSC). One of the putative molecules of CSCs is CD44. Recent studies have established a crucial link between the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the acquisition of molecular and functional properties of stem cells. For that reason we analyzed the expression of proteins CD44, Cytokeratins AE1/AE3 and Vimentin, in dogs mammary tumors, to investigate the potencial for CSC markers, and its relation with the EMT using immunohistochemistry in paraffin embedded tissues making use of techniques such as Tissue MicroArrays (TMA). Immunostaining of cytokeratin had no significant difference between benign and malignant tumors ($p \geq 0,05$), being more intense in malignant tumors. However vimentina showed higher staining intensity in benign tumors, but with no significant difference ($p \leq 0,05$). The expression of CD44 was higher in malignant tumors that have greater proliferative and metastatic potencial, however its relation with EMT was not detected in the analyzed tumors. The techniques applied for the TMAs were efficient and can be used in routine and later researches.

KEY WORDS. Dog, cancer stem cells, CD44, immunohistochemistry.

RESUMO. Os tumores mamários são as mais frequentes neoplasias em cadelas, representando cerca de 50% dos tumores diagnosticadas nesta espécie e tem maior incidência em fêmeas de meia idade a idosas. Têm sido utilizadas como modelo de estudo

para neoplasias mamárias de mulher devido às várias características comuns como as similaridades histológicas e imuno-histoquímicas. Na última década, estudos baseados nos perfis moleculares das neoplasias mamárias, tornaram possível a identifi-

* Recebido em 25 de junho de 2012.

Aceito para publicação em 22 de julho de 2013.

¹ Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp-Araçatuba), Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil. +Autora para correspondência. E-mail: gabi_mayvet@yahoo.com.br E-mail: millabpaiva@gmail.com - bolsistas CNPQ e FAPESP, respectivamente.

² Médica-veterinária, DSc. Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, UNESP-Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. E-mail: shvperri@fmva.unesp.br

³ Médica-veterinária, DSc., Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP-Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. E-mail: ruimcl@fmva.unesp.br

cação de algumas células neoplásicas com características de células tronco - as células tronco tumorais (CTT). Uma das moléculas putativas para marcação das CTTs é o CD44. Estudos recentes estabeleceram um elo crucial entre a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a aquisição de propriedades moleculares e funcionais de células-tronco. Por este motivo analisamos a expressão das proteínas CD44, Citoqueratinas AE1/AE3 e Vimentina, em tumores mamários de cadelas a fim de investigar o potencial de marcação de CTTs e sua relação com a EMT. Para tal foram utilizados métodos de imunohistoquímica em tecidos parafinizados, fazendo-se uso da técnica de Tissue MicroArrays (TMA). Nas amostras de tecido parafinado, a imunomarcação da citoqueratina demonstrou diferença significativa entre tumores benignos e malignos ($p \geq 0,05$), mostrando-se mais intensa em tumores malignos. Já a vimentina apresentou maior intensidade de marcação em tumores benignos, porém não apresentando diferença significativa ($p \leq 0,05$). A expressão do CD44 foi maior em tumores malignos que possuem maior potencial proliferativo e metastático, porém não foi detectada relação com a EMT, nos tumores analisados. A técnica para a montagem dos TMAs foi eficiente, podendo ser utilizadas na rotina e em pesquisas posteriores.

PALAVRAS-CHAVE. Cão, células tronco neoplásicas, CD44, Imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

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

Um importante desafio à pesquisa do câncer é entender como alterações genéticas associadas à tumorigênese contribuem para as alterações celulares e biológicas que podem ser reconhecidas como malignas (Ricardo et al. 2011).

A proliferação celular é controlada por sinais do microambiente que podem ser tanto inibidores como estimulatórios. Porém a patogênese molecular

de invasão e metástase dos tumores de mama ainda é pouco conhecida. Recentemente foram realizados estudos em tumores mamários em mulheres, com o objetivo de identificar e entender as moléculas expressas pelas células tumorais, por meio de análise imuno-histoquímica utilizando anticorpos relacionados a metástases e proliferação celular, associados às células com características de células tronco (Ali et al. 2011, Wu et al. 2011). Na última década, tratamentos clínicos foram desenvolvidos baseados nos perfis moleculares das células tumorais mamárias. Assim, a terapia mais promissora teve origem na identificação de determinadas células neoplásicas com características de células tronco, denominadas células tronco tumorais (CTT) (Ricardo et al. 2011).

Uma das moléculas envolvidas na marcação das CTTs é o CD44 (Goodison & Tarin 1998, Paltian et al. 2009), e a sua expressão alterada já foi relatada em diversas neoplasias (Sneath & Mangham 1998, Herrera-Gayol & Jothy 1999). Existem evidências que sustentam a idéia de que o CD44 juntamente com o CD24, que são marcadores de membrana celular, em combinação com o aldeído desidrogenase (ALDH), seriam os mais precisos para a identificação e isolamento das CTTs em tumores mamários, porém existem muitas discrepâncias entre os resultados (Ginestier et al. 2007). Por este motivo, torna-se imperativo identificar mais precisamente as CTTs, principalmente em tecidos caninos, para maior compreensão das mesmas nas neoplasias mamárias (Ricardo et al. 2011).

Estudos recentes estabeleceram ainda um elo crucial entre a transição epitelial-mesenquimal (EMT) e a aquisição de propriedades moleculares e funcionais de células-tronco (Mani et al. 2008, Morel et al. 2008). Além do aumento do potencial de invasão e metástases, a indução da EMT em células epiteliais imortalizadas de tumores mamários humanos, elevou significativamente a sua capacidade de auto-renovação, e a expressão de marcadores associados às CTTs (Mani et al. 2008). A EMT pode ser estimulada por sinais extracelulares e por fatores do microambiente, sugerindo uma possível explicação para a nova geração de CTTs provindas de células tumorais diferenciadas, indicando que provavelmente a passagem pela EMT seja relevante e/ou necessária para a tumorigênese (May et al. 2011). Em neoplasias mamárias foi associada à indução de EMT a marcação positiva de CD44 e outras características de células tronco, sugerindo um fenótipo

antigênico que poderia detectar CTTs associadas a EMT com elevada capacidade tumorigênica (Mani et al. 2008, Pang et al. 2011).

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras estudadas foram obtidas junto ao Serviço de Patologia Veterinária de onde foram selecionados 49 casos de tumores mamários em cadelas. Os tumores foram submetidos à reavaliação anatomopatológica e classificados de acordo com Cassali et al. (2011), dos quais foram preparadas lâminas histológicas de TMAs utilizando o método descrito por Pires et al. (2006) modificado.

Para a construção das lâminas de TMA, foram utilizadas agulhas hipodérmicas 40x16 que tiveram as suas pontas cortadas e feita uma pequena abertura lateral de aproximadamente 2mm imediatamente abaixo do canhão. A agulha modificada foi então acoplada a uma máquina de ilhós manual, onde foram retirados cilindros dos blocos de parafina dos casos selecionados, previamente marcados em áreas que continham amostra de tecido neoplásico. Para retirar os cilindros de dentro da agulha foi utilizada uma pequena haste de metal colocada pela abertura lateral, podendo assim empurrar a amostra de tecido. Uma fita adesiva dupla face foi colocada no fundo de uma forma de metal para inclusão de blocos em parafina, onde foram marcados com caneta permanente pontos separados a cada 2mm de distância, locais onde os cilindros foram colados na vertical. Após todas as amostras serem coladas na forma, foi adicionada parafina na temperatura de 56 - 58°

C. Destes blocos foram feitos cortes histológicos de 3µm e depositados em lâminas que foram coradas pela técnica da hematoxilina e eosina, em seguida montadas e analisadas à microscopia óptica. Também foram retirados cortes de 3µm dos blocos de TMAs para os ensaios imuno-histoquímicos. Os anticorpos utilizados foram: Anti-Citoqueratina (Clone AE1/AE3, Monoclonal Mouse Anti Human, Dako, EUA), na diluição 1:300; Anti-Vimentina (Clone V9, Monoclonal Mouse Anti Swine, Dako, EUA) na diluição 1:400 e CD44 (Clone YKIX337.8.7, Monoclonal Rat Anti Dog, Serotec) na diluição 1:100. Após o processo de desparafinação e re-hidratação, os cortes de tecido foram submetidos a recuperação em tampão citrato pH 6,0 em microondas. Em seguida, foi realizada a inibição da peroxidase endógena e a inibição de ligações inespecíficas. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários na diluição ótima por 30 minutos em temperatura ambiente e, "overnight" sob-refrigeração. Sempre em cada uma das lâminas e nas duplicatas, um corte recebeu PBS ao invés do anticorpo primário, como controle negativo da reação. Foi utilizado o método LSAB (DAKO®) para detecção da reação antígeno-anticorpo de acordo com as instruções do fabricante. A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina (DAB) e a contra coloração com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação, montagem e análise em microscópio óptico.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 49 tumores mamários espontâneos de cadelas analisados, 21/49 (42,8%) foram classificados como neoplasias benignas, e 28/49 (57,1%) como formações malignas (Tabela 1). A idade do animal é um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento dos tumores mamários na espécie canina (Sorenmo et al. 2011). No presente estudo a idade dos animais acometidos variou de 3 a 15 anos, apresentando uma média de 9,3 anos. Este resultado concorda com Dorn et al. (1968), que documentaram maior incidência em animais de 9 a 11 anos, analisando cadelas de várias raças distintas.

Os estudos em relação às raças acometidas são controversos, pois variam muito dependendo do

Tabela 1. Classificação dos tipos histopatológicos de tumores da glândula mamária de cadelas (n=49), segundo classificação de Cassali et al. (2011).

Amostras	Classificação histopatológica	Quantidade
Benignos	Papiloma Ductal	2
	Adenoma Complexo	6
	Tumor Misto Benigno	13
Malignos	Carcinoma Tubular	1
	Carcinoma em Tumor Misto	5
	Carcinoma Papilar	10
	Carcinoma Complexo	12

país, cidade ou até da região onde foi conduzido o estudo. Neste sentido, estudos europeus apontam os animais da raça boxer como os de maior incidência (Bronden et al. 2010, Moe et al. 2001), enquanto estudos norte americanos mostram a raça sub representada (Brodey et al. 1983, Goldschmidt et al. 2001). A raça de maior incidência em nossa região foi a SRD (sem raça definida), ocorrendo em 40,8% (20/49) dos casos, seguida das raças Pastor Alemão e Pinscher, ambos aparecendo em 12,2% (6/49) dos casos.

A classificação dos tipos histopatológicos dos tumores mamários de cadelas ainda constitui motivo de estudo e de grande impacto na Medicina Veterinária. Por este motivo foram adotados os critérios propostos por Cassali et al. (2011) a fim de se obter uma padronização nos diagnósticos elaborados (Tabela 1).

A imunomarcção resultante do uso do anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3 nos tecidos de diferentes tipos histológicos de tumores mamários, mostrou maior escore nas células de origem epitelial das neoplasias malignas (p<0,05) (Tabela 2). De acordo com Becker et al. (2007) e Hardy et al. (2007), a EMT é um importante processo molecular para a

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

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

^aTeste de Mann-Whitney.

progressão e a metástase tumoral, e tem como principal aspecto a perda da expressão de marcadores das proteínas epiteliais como as citoqueratinas. Esta relação com a EMT não foi observada no presente estudo, o qual demonstrou maior expressão das citoqueratinas AE1/AE3 em tumores malignos, que apresentam potencial metastático (Figura 1a).

Outro aspecto da EMT é a maior expressão de marcadores mesenquimais, o que está relacionado ao fenótipo mais invasivo e de pior prognóstico em tumores de mama e de vesícula urinária em humanos (Moody et al. 2005, Baumgart et al. 2007). Em nossos ensaios realizados com o anticorpo anti-vimentina, utilizado para detectar células de origem mesenquimal, observamos intensa marcação citoplasmática em células fusiformes, condizentes com o mioepitélio e fibroblastos do parênquima mamário e não nas células neoplásicas demonstrando não

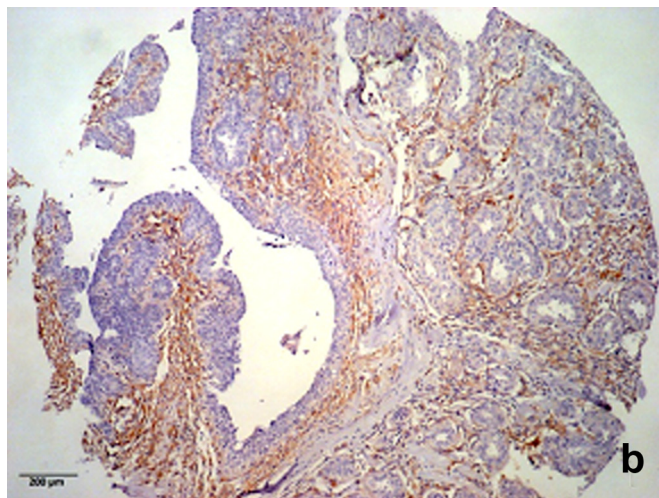
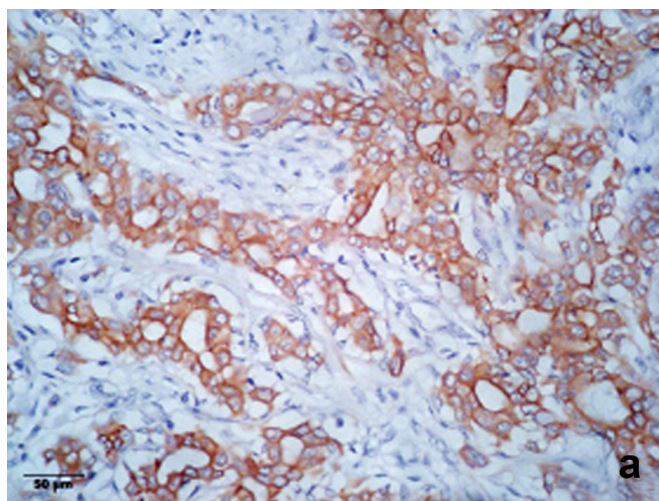


Figura 1. Glândula mamária de cadela. Carcinoma complexo evidenciando a expressão positiva do anticorpo anti-citoqueratina no citoplasma das células epiteliais (a); Amostra de TMA apresentando imunomarcção positiva para o anticorpo anti-vimentina em áreas de proliferação estromal (b).

haver relação com a EMT nestas neoplasias. Esta marcação apresentou maiores escores vistos nos tumores benignos ($p \geq 0,05$), (Tabela 2), mais especificamente nos casos classificados como adenomas complexos, corroborando com Sarli et al. (2004) e Gama et al. (2010), que observaram frequente diminuição da expressão de citoqueratinas e consequente aumento da expressão da vimentina em tumores da glândula mamária, que apresentam maior proliferação estromal e vascular, como os tumores complexos (Figura 1b).

Nas neoplasias mamárias estudadas, independente da classificação morfológica, foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os escores dos tumores benignos e malignos (Tabela 2). A expressão do CD44 esteve predominantemente relacionada às células epiteliais ductais, e em menor grau com as células alveolares da glândula mamária. A expressão do CD44 nos outros componentes celulares das neoplasias analisadas foi de expressão reduzida ou nula, como a observada nas células mioepiteliais, fibroblastos e células endoteliais, semelhante aos achados de Alldinger et al. (1999) e Paltian et al. (2006) (Figura 2a).

Das neoplasias benignas, os adenomas complexos foram os que apresentaram maior intensidade e homogeneidade na expressão de CD44, tanto nas áreas neoplásicas quanto no parênquima mamário normal, além de marcação em poucas células mioepiteliais (Figura 2b). Em 19 adenomas complexos analisados por Paltian et al. (2006), também foi observada homogeneidade de expressão do CD44 em células epiteliais e mioepiteliais, sem diferença significativa entre áreas centrais e periféricas do tumor ($p \geq 0,05$). Na mulher, estudos em neoplasias mamárias benignas demonstraram marcação de CD44 principalmente nas células epiteliais alveolares, porém havendo expressão no tecido normal adjacente (Bankfalvi et al. 1998). Já, Auvinen et al. (2005), não observaram expressão significativa nos tumores mamários benignos estudados em humanos. As neoplasias malignas apresentaram escores mais elevados se comparados aos tumores benignos ($p \geq 0,05$). Estes resultados divergem dos obtidos por Paltian et al. (2006) que observaram elevada expressão de CD44 em células epiteliais de adenomas, comparada a expressão em carcinomas. A diversidade de expressão deste antígeno entre os tumores benignos e malignos pode estar relacionada a diferentes taxas proliferativas que cada tipo de tumor apresenta, já que não foram observadas diferenças significativas

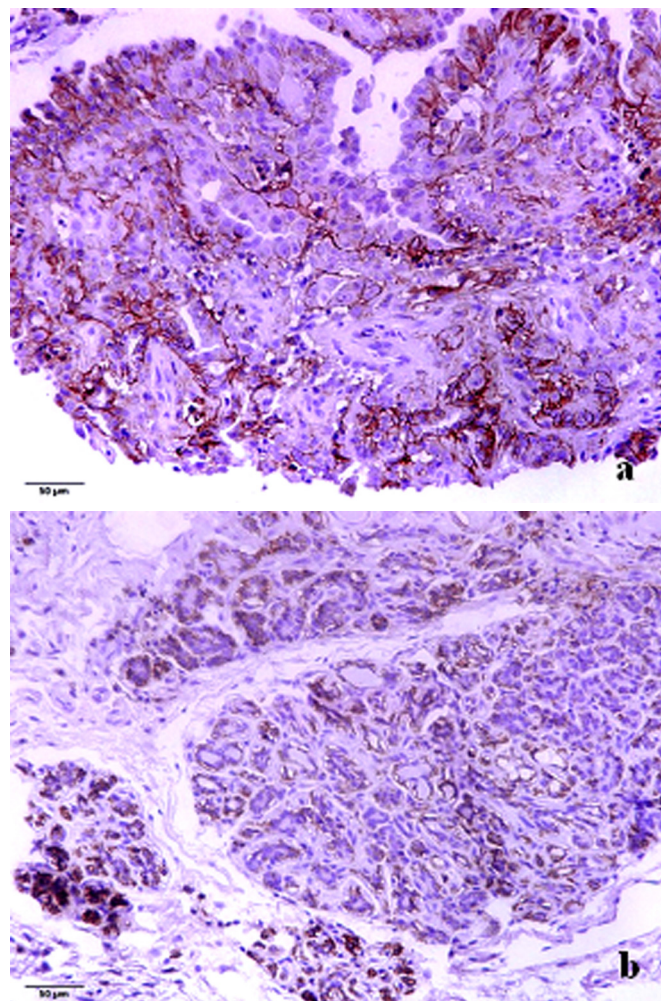


Figura 2. Carcinoma em tumor misto apresentando imunomarcação de membrana celular pelo anticorpo anti-CD44. Evidenciação de células epiteliais carcinomatosas marcadas pelo anticorpo (a); área adjacente ao tumor apresentando tecido mamário com poucas alterações, também imunomarcadas pelo anti-CD44 (b).

entre os mesmos ($p \geq 0,05$), aliado a expressão importante nos tecidos normais adjacentes aos tumores (Blacking et al. 2011).

CONCLUSÕES

A expressão do CD44 foi maior em tumores malignos que possuem maior potencial proliferativo e metastático, porém por sua marcação ter apresentado variações entre tumores de mesma classificação histológica, e por ter sido expresso igualmente em áreas de tecido mamário normal adjacente a neoplasia, a sua utilidade como marcador de CTTs em neoplasias mamárias caninas ainda necessita de estudos mais detalhados. Apresentou ainda, maior marcação em células que expressaram proteínas de origem epitelial, mostrando não ter relação com a EMT nesses tumores caninos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali H.R., Dawson S.J., Blows F.M., Provenzano E., Phrarah P.D. & Caldas C. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res.*, 13:118, 2011.
- Alldinger S., Baumgartner W., Kremmer E. & Fonfara S. Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. *J. Vet. Med.*, 46:19-32, 1999.
- Auvinen P., Tammi R., Tammi M., Johansson R. & Kosma V.M. Expression of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan. *Histopathology*, 47:420-28, 2005.
- Bankfalvi A., Terpe H.J., Breukelmann D., Bier B. & Rempe D. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumour progression. *Histopathology*, 33:107-116, 1998.
- Baumgart E., Cohen M.S., Silva N.B., Jacobs M.A., Wotkowicz C., Rieger-christ K.M., Biolo A., Zeheb R., Loda M. & Libertino J.A. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin. Cancer Res.*, 13:1685-94, 2007.
- Becker K.F., Rosivatz E., Blechschmidt K., Kremmer E., Sarrbia M. & Hofler H. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells Tissues Organs*, 185:201-212, 2007.
- Blacking T.M., Waterfall M. & Argyle D.J. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 141:46-57, 2011.
- Bostock D.E. Canine and feline mammary neoplasms. *British Vet. J.*, 142:506-515, 1986.
- Brodey R.S., Goldschmidt M.H., Roszel J.R. Canine mammary gland neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 19:61-90, 1983.
- Bronden L.B., Nielsen S.S., Toft N. & Kristensen A.T. Data from the Danish veterinary cancer registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Vet. Rec.*, 166:586-90, 2010.
- Cassali G.D., Lavalle G.E., De Nardi A.B., Ferreira E., Bertagnolli A.C., Estrela-Lima A., Alessi A.C., Daleck C.R., Salgado B.S., Fernandes C.G., Sobral R.A., Amorim R.L., Gamba C.O., Damasceno K.A., Auler P.A., Magalhães G.M., Silva J.O., Raposo J.B., Ferreira A.M.R., Oliveira L.O., Malm C., Zuccari D.A.P.C., Tanaka N.M., Ribeiro L.R., Campos L.C., Souza C.M., Leite J.S., Soares L.M.C., Cavalcanti M.F., Fonteles G.C., Schuch I.D., Paniago J., Oliveira T.S., Terra E.M., Castanheira T.L.L., Felix A.O.C., Carvalho G.D., Guim T.N., Guim T.N., Garrido E., Fernandes S.C., Maia F.C.L., Dagli M.L.Z., Rocha N.S.R., Fukumasu H., Grandi F., Machado J.P., Silva S.M.M.S., Bezerril J.E., Frehse M.S., Paes-de-Almeida E.C. & Campos C.B. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz. J. Vet. Pathol.*, 4:153-180, 2011.
- Daleck C.R., Franceschini P.H., Alessi A.C., Santana A.E. & Martins M.I.M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Cienc. Rur.*, 28:95-100, 1998.
- Dorn C.R., Taylor D.O., Scheneider R., Hibbard H.H. & Klauber M.R. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California, II: cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Nat. Cancer Inst.*, 40:307-318, 1968.
- Gama A., Alves A. & Schmitt F. Expression and prognostic significance of CK19 in canine malignant mammary tumours. *Vet. J.*, 184:45-51, 2010.
- Ginestier C., Hur M.H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C.G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M.S. & Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1:555-67, 2007.
- Goldschmidt M.H., Shofer F.S. & Smelstoy J.A. Neoplastic lesions of the mammary gland, p.168-178. In: Mohr U. (Ed.), *Pathobiology of The Aging Dog*. ISU Press, Ames, 2001.
- Goodison S. & Tarin D. Current status of CD44 variant isoforms as cancer diagnostic markers. *Histopathology*, 32:1-6, 1998.
- Hardy R.G., Vicente-Duenas C., Gonzales-Herrero I., Anderson C., Flores T., Hughes S., Tselepis C., Ross J.A. & Sanchez-Garcia I. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis. *Am. J. Pathol.*, 171:1037-46, 2007.
- Herrera-Gayol A. & Jothy S. CD44 modulates Hs578T human breast cancer cell adhesion, migration, and invasiveness. *Exp. Mol. Pathol.*, 66:99-108, 1999.
- Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G. & Kallioniemi O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.*, 4:844-47, 1998.
- Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J. & Weinberg R.A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133:704-715, 2008.
- Martins A.M.C.R.P.F., Tamaso E. & Guerra J.L. Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the extracellular matrix. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 39:38-42, 2002.
- May C.D., Sphyris N., Evans K.W., Werden S.J., Guo W. & Mani S.A. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.*, 13:1-10, 2011.
- Misdorp W., Else R.W., Helleman E. & Lipscomp T.P. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In: *WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 1999.
- Moe L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:439-43, 2001.
- Moody S.E., Perez D., Pan T.C., Sarkisian C.J., Portocarrero C.P., Sterner C.J., Notorfrancesco K.L., Cardiff R.D. & Chodosh L.A. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell*, 8:197-209, 2005.
- Morel A.P., Lievre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S. & Puisieux A. Generation of Breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 3:e2888, 2008.
- Paltian V., Alldinger S., Baumgartner W. & Wohlsein P. Ex-

- pression of CD44 in canine mammary tumours. *J. Comp. Pathol.*, 141:237-247, 2009.
- Pang L.Y., Cervantes-Aria A., Else R.W. & Argyle D.J. Canine mammary cancer stem cells are radio and chemoresistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Cancers*, 3:1744-62, 2011.
- Pires A.R.C., Andreiulo F.M. & Souza S.R. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. *Diag. Pathol.*, 1:1-5, 2006.
- Ricardo S., Vieira A.F., Gerhard R., Leitão D., Pinto R., Camelelle J.F., Milanezi F., Schmitt F. & Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.*, Online First, 16 Jun, 2011. Disponível em: <<http://www.jcp.bmj.com/>>. Acesso em: 28 jun. 2011.
- Sarli G., Preziosi R., de Tolla L., Brunetti B. & Benazzi C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *J. Vet. Diag. Investig.*, 16:542-47, 2004.
- SAS Institute Inc. *The SAS System, release 9.2*. SAS Institute Inc., Cary:NC, 2008.
- Sneath R.J. & Mangham D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol. Pathol.*, 51:191-200, 1998.
- Sorenmo K.U., Rasotto R., Zappulli V. & Goldschmidt M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. *Vet. Pathol.*, 48:85-97, 2011.
- Wu H., Li R., Hang X.D., Yan M., Niu F., Liu W., Zhao S. & Zhang S. Can CD44+/CD24- Tumor cells be used to determine the extent of breast cancer invasion following neoadjuvant chemotherapy? *J. Breast Cancer*, 14:175-180, 2011.