YONARA DE GOUVEIA CORDEIRO

**Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de
cadela e caracterização de possíveis populações de Células
Iniciadoras de Tumor**

São Paulo

2015

YONARA DE GOUVEIA CORDEIRO

**Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de
cadela e caracterização de possíveis populações de Células
Iniciadoras de Tumor**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental e
Comparada da Faculdade de
Medicina Veterinária da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento: Patologia

Área de Concentração: Patologia
Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Heidge
Fukumasu

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3110
FMVZ

Cordeiro, Yonara de Gouveia

Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de Células Iniciadoras de Tumor / Yonara de Gouveia Cordeiro. -- 2015.
130 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Heidge Fukumasu.

1. Cães. 2. Células iniciadoras de tumor. 3. Câncer de mama. 4. Oncologia comparada. I. Título.

ERRATA

CORDEIRO, Y. G. Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de Células Iniciadoras de Tumor. 2015. 130 f.
Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Página	Onde se lê	Leia-se
Capa: Título	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor
Página de rosto	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor
Folha de Avaliação	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor
Ficha catalográfica	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor
RESUMO	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor
ABSTRACT	Células Iniciadoras de Tumor	células iniciadoras de tumor

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de células iniciadoras de tumor", protocolado sob o nº 2894/2013, utilizando 50 (cinquenta) cães, sob a responsabilidade Prof. Dr. Heidge Fukumasu, foi aprovado em reunião de 4/12/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Primary cell cultures derived from canine mammary carcinomas and the characterization of its possible populations of tumor initiating cells", protocol number 2894/2013, utilizing 50 (fifty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Heidge Fukumasu, was approved in the meeting of day 12/4/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 10 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CORDEIRO, Yonara de Gouveia

Título: Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de Células Iniciadoras de Tumor

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À ela, meu exemplo de ser humano, meu exemplo de caráter e de coragem.

Meu porto seguro, minha conselheira, minha amiga, minha mãe.

Nada nessa minha humilde vida teria sentido sem você.

E tudo que eu conquistei, conquisto e conquistarei daqui pra frente,

foi, é e será, sempre graças à você.

Te amo muito, Ana Maria!

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre, por ter ouvido as minhas preces desesperadas quando já não tinha mais pra onde correr. Por me fazer jamais perder a fé e a esperança. E por sempre me conduzir ao caminho certo, na maioria das vezes não no momento em que pedi, mas no momento que Ele sabia que era o certo;

À minha mãe Ana Maria, que sempre acreditou em mim. A pessoa a quem devo meu caráter, minha força, minha independência. Obrigada por não ter desistido todas as vezes em que eu pensei em desistir. Por ter me mantido aqui. Por ter me ensinado desde cedo que quem faz nossa vida é a gente, basta corrermos atrás. Agradeço todos os dias por ter vindo ao mundo através de você.

À minha família. Ao meu avô, meu exemplo de força e superação. Ao meu anjo da guarda, minha avó, que de outro plano olha por mim em todos os momentos, e está ali me dando proteção e acalmando meu coração. Às minhas tias, Iolanda, Nice e Tereza, pelos mimos, carinhos e momentos de alegria. Aos tios, primos e primas, por me mostrarem o sentido da palavra família. Nada me faz mais feliz do que voltar pra casa e sentir a alegria que é estar com vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Heidge Fukumasu, que me recebeu desde o primeiro dia de estágio obrigatório, e me deu a oportunidade de estar aqui hoje, anos depois. Sem dúvidas é um exemplo de inteligência e sucesso e que, de muitas formas, contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal aqui dentro.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, pela contribuição com este projeto, pela transmissão de conhecimento, e por sempre estar disposto a ajudar, foi um professor e tanto; e ao Prof. Dr. José Bento. S. Ferraz pelos conselhos, pelas histórias, pelo carinho;

Aos clínicos veterinários que cederam amostras para este trabalho. Alessandra, Marcus, Mariney, Juliana, Milena, Sílvio, Tânia, Beatriz, Bruno, Paulo, Nilson, Valmir, Mariana, João Paulo. Sem vocês não teria sido possível;

Às amigas, Pâmela (sobrevivemos amiga!), Camila e Thayla, que estão comigo desde sempre. Não teria a menor graça sem vocês aqui. Obrigada por tudo, pela amizade, por cada lembrança compartilhada, por dividir tristezas e alegrias;

À todos os colegas e a amigos do LOCT. Principalmente ao Pedro, pelo companheirismo e por sempre ter me ajudado quando precisei, sou muito feliz por ter você trabalhando comigo e mais ainda por te ter como amigo; Arina, por ter me iniciado nesta vida louca de cultivo de

células, lá nos primórdios do estágio, e por ainda me ajudar nos momentos de dificuldades, além de, claro, pelos momentos de amizade e descontração; Lídia, pela amizade, pelos ótimos momentos aqui e nas viagens malucas, pelos conselhos, pelas dicas e ajuda com protocolos e dissertação; Francisco, que vai entrar junto nos agradecimentos do LOCT sim! Obrigada por tantos bons momentos, e por ter aguentado as crises de desespero. Enfim, a todos os colegas deste novo laboratório que eu me orgulho em fazer parte. Só quem estava aqui no antes e agora está no depois, sabe como é gratificante a sensação de estarmos tão longe;

Aos alunos de Iniciação Científica, Fábio, Lucas, Sirlene, Erika e Fernanda, que contribuíram para minha formação profissional aqui dentro, sempre tive muito gosto de estar com vocês. Além de pseudo-orientados, ganhei amigos;

À Mariane, Jean e Leonardo, queridos amigos de departamento. São Paulo foi muito mais divertida com vocês. Não teria como começar o mestrado de forma mais agradável. O diamante de Homer ficará para sempre na memória;

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles, por compartilhar o espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho. E por todos os amigos que ali fiz durante este período, que estiveram presentes em muitos momentos de alegria. Ana Mançanares, obrigada pela amizade e disposição sempre. E a todos os demais colegas do LMMD;

À todos os amigos, principalmente paranaenses, por compreenderem cada vez que não pude estar presente. Me fizeram muita falta. Câmi, Tassi e Aninha, para sempre na minha vida e no meu coração;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo acolhimento. À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Patologia Experimental e Comparada, por proporcionar a formação acadêmica; e à CAPES, FAPESP e CNPq pelo financiamento deste trabalho;

E à Becca, minha fiel companheira, que me dirige aquele olhar de amor que só os cães tem, mesmo nos piores momentos de frustração.

Muito obrigada.

“E até lá, vamos viver
Temos muito ainda por fazer
Não olhe pra trás

O mundo começa agora
Apenas começamos”

- Renato Russo

RESUMO

CORDEIRO, Y. G. **Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de Células Iniciadoras de Tumor.** [Primary cell culture of canine mammary carcinoma and characterization of possible populations of Tumor Initiation Cells]. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Em animais, a prevalência do câncer tem aumentado de forma significativa com o passar dos anos. As neoplasias mamárias representam o tipo mais frequente de câncer em cadelas, chegando a 52% da população de fêmeas, e entre os animais afetados, 50% das neoplasias se apresentam sob a forma maligna. O desenvolvimento e caracterização de modelos animais para o estudo de neoplasias humanas é de extrema relevância para a melhoria no diagnóstico e tratamento do câncer. Os tumores sólidos apresentam uma hierarquia entre as células que determina o desenvolvimento e o comportamento da neoplasia. Recentemente, tem-se estudado um pequeno grupo de células que apresentam diversas características das células-tronco normais encontradas nos tecidos. Estas células, denominadas Células Iniciadoras de Tumor (CITs), são descritas como sendo as principais responsáveis pelas falhas na quimioterapia e no aparecimento de recidivas tumorais, devido ao grande potencial de renovação e diferenciação que elas possuem. Desta maneira, nosso objetivo foi caracterizar linhagens celulares provenientes de neoplasia de glândula mamária de cadelas que pudessem ser utilizadas futuramente na pesquisa básica e aplicada em oncologia comparada. Além das alterações citogenéticas e imunocitoquímicas, verificamos que os cultivos celulares apresentaram quantidades distintas de populações positivas e negativas quanto à expressão de CD24 e CD44 bem como da atividade de aldeído-desidrogenase, porém, todos exibiram potencial tumorigênico *in vitro* através do ensaio de formação de tumoresferas.

Palavras-chave: Cães. Células iniciadoras de tumor. Câncer de mama. Oncologia comparada.

ABSTRACT

CORDEIRO, Y. G. Primary cell culture of canine mammary carcinoma and characterization of possible populations of Tumor Initiation Cells. [Cultivo primário de células oriundas de carcinomas mamários de cadelas e caracterização de possíveis populações de Células Iniciadoras de Tumor]. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The prevalence of cancer in animals has increased significantly over the years. Mammary tumors are the most common cancer in dogs, reaching 52% of female population, and among affected animals, 50% of tumors are presented in the malignant form. The development and characterization of animal models for the study of human cancers is extremely important for improving the diagnosis and treatment of cancer. Solid tumors have a hierarchy of cells that determines the development and behavior of cancer. Recently, there has been studied a small group of cells with different characteristics from those normal stem cells found in tissues. These cells, known as tumor initiating cells (TICs), are described as being primarily responsible for the failures in chemotherapy and the appearance of recurrences, because of their potential for renewal and differentiation. Thus, our objective was to characterize cell lines derived from mammary gland neoplasia of dogs that could be further used for basic and applied research in comparative oncology. In addition to the cytogenetic and immunocytochemical changes, we found that cell cultures had different amounts of positive and negative populations of CD24 and CD44 expression and aldehyde dehydrogenase activity, however, all exhibited tumorigenic potential in vitro through tumorspheres formation.

Keywords: Canine. Comparative oncology. Mammary cancer. Tumor initiating cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incidência e mortalidade de câncer no âmbito mundial	21
Figura 2 -	Representação das taxas brutas de incidência por 100 mil indivíduos, em homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014	24
Figura 3 -	Taxas de incidência do câncer de mama em mulheres na população mundial	26
Figura 4 -	Taxas brutas de incidência, em 100 mil mulheres, de neoplasias malignas de mama estimadas para o ano de 2014	26
Figura 5 -	Modelo de desenvolvimento de tumores sólidos a partir da expansão clonal proposta por Nowell.	31
Figura 6 -	Modelos de desenvolvimento neoplásico.	33
Figura 7 -	Transição epitélio-mesenquimal (EMT) e transição mesenquima-epitelial (MET) para formação de tumor secundário	36
Figura 8 -	Células provenientes da dissociação de neoplasias mamárias de cadelas, em condições de aderência	64
Figura 9 -	Lâmina histológica da amostra 005/13	66
Figura 10 -	Morfologia do cultivo celular, amostra 005/13	67
Figura 11 -	Lâmina histológica da amostra 020/14	68
Figura 12 -	Morfologia do cultivo primário, amostra 020/14	69
Figura 13 -	Lâmina histológica da amostra 025/14	70
Figura 14 -	Morfologia do cultivo celular, amostra 025/14	71
Figura 15 -	Lâmina histológica, amostra 028/14	73
Figura 16 -	Morfologia do cultivo celular, amostra 028/14	74
Figura 17 -	Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 005/13.....	77
Figura 18 -	Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 005/13.....	78
Figura 19 -	Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 025/14.....	79

Figura 20 - Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 025/14.....	80
Figura 21 - Avaliação dos cromossomos por coloração convencional, amostra 028/14	81
Figura 22 - Avaliação dos cromossomos por coloração convencional, amostra 028/14	82
Figura 23 - Marcação imunocitoquímica, amostra 005/13	84
Figura 24 - Marcação imunocitoquímica, amostra 020/14	85
Figura 25 - Marcação imunocitoquímica, amostra 025/14	86
Figura 26 - Marcação imunocitoquímica, amostra 028/14	87
Figura 27 - Marcação imunocitoquímica para expressão de vimentina em diferentes passagens, amostra 020/14.....	88
Figura 28 - Marcação imunocitoquímica para expressão de vimentina em diferentes passagens, amostra 028/14.....	88
Figura 29 - Análise das populações de células com maior atividade de aldeído-desidrogenase	90
Figura 30 - Formação de tumoresferas, amostra 020/14	97
Figura 31 - Agregados celulares formados a partir do sétimo dia, amostra 028/14.....	97
Figura 32 - Formação de esferas em cultivo de baixa aderência após as separações por <i>beads</i> magnéticas.....	102
Figura 33 - Aglomerado de células em proliferação, amostra 028/14	103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Incidência registrada de câncer na população mundial, homens e mulheres - 2012	21
Gráfico 2 - Mortalidade registrada na população mundial, homens e mulheres - 2012	22
Gráfico 3 - Frequência de neoplasias mamárias em fêmeas e distribuição dos casos por idade	44
Gráfico 4 - Distribuição dos casos nos trinta e cinco cães coletados no estudo, baseado no tecido de origem e número de lesões por animal	60
Gráfico 5 - Distribuição dos casos quanto à idade (anos) e raça	61
Gráfico 6 - Análise do número de cromossomos em vinte metáfases por cultura celular	76
Gráfico 7 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH ^{low} e ALDH ^{hi} , amostra 005/13	94
Gráfico 8 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH ^{low} e ALDH ^{hi} , amostra 020/14	95
Gráfico 9 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH ^{low} e ALDH ^{hi} , amostra 025/14	95
Gráfico 10 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH ^{low} e ALDH ^{hi} , amostra 028/14	96
Gráfico 11 - Avaliação do crescimento de tumoresferas após a separação para os fenótipos CD24 ⁻ e CD24 ⁺	100
Gráfico 12 - Avaliação do crescimento de tumoresferas após a separação para os fenótipos CD44 ⁻ e CD44 ⁺	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das lesões segundo classificação histopatológica	61
Tabela 2 - Culturas primárias de neoplasias de glândula mamária em cães, selecionadas para caracterização celular	64
Tabela 3 - Tempo de duplicação celular das quatro amostras cultivadas.....	75
Tabela 4 - Porcentagens de células ALDH ⁺ nas quatro amostras de carcinomas mamários caninos	89
Tabela 5 - Quantificação das populações CD24 e CD44 através da separação por <i>beads</i> magnéticas, em neoplasia mamária de cães	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Incidência e mortalidade do câncer no mundo	20
Quadro 2 - Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não-melanoma - 2014	23
Quadro 3 - Marcadores de células-tronco cancerosas em tumores sólidos	39
Quadro 4 - Prospecção do isolamento de células-tronco de tumores mamários humanos de tecidos frescos dissociados	40
Quadro 5 - Principais características relacionadas ao estudo da espécie <i>Canis familiaris</i> na oncologia comparada.	42
Quadro 6 - Clínicas parceiras que contribuíram com amostras para o presente estudo	51
Quadro 7 - Anticorpos utilizados para avaliação imunocitoquímica	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	CONCEITOS GERAIS SOBRE CÂNCER	19
2.2	NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	24
2.3	MODELOS DE DESENVOLVIMENTO NEOPLÁSICO	29
2.3.1	<i>Modelo estocástico ou expansão clonal</i>	29
2.3.2	<i>Modelo hierárquico ou teoria das Células-tronco Cancerosas.....</i>	32
2.4	CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS NO CÂNCER DE MAMA	37
2.5	ONCOLOGIA COMPARADA.....	40
2.5.1	<i>Tumores espontâneos em cães – neoplasias mamárias.....</i>	40
2.5.2	<i>Células-tronco cancerosas em neoplasias mamárias em cães</i>	46
3.	OBJETIVO GERAL.....	49
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
5.	MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1	MATERIAL UTILIZADO NO ESTUDO.....	51
5.2	CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS ORIUNDAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS	52
4.3	TEMPO DE DUPLICAÇÃO CELULAR	53
5.4	AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA POR CARIOTIPAGEM.....	54
5.5	IMUNOCITOQUÍMICA.....	55
5.6	SEPARAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES POR BEADS MAGNÉTICAS ATRAVÉS DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CD24/CD44	56
5.7	SEPARAÇÃO DE POPULAÇÕES POSITIVAS PARA A ATIVIDADE DE ALDEÍDO-DESIDROGENASE (ALDH) ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO	57
5.8	CULTIVO CELULAR PARA FORMAÇÃO DE TUMORESFERAS	58
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
6.	RESULTADOS.....	60
6.1	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS	60
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS CULTIVOS CELULARES	62
6.2.1	<i>Dissociação e cultivo primário em monocamada</i>	62
6.2.2	<i>Classificação histopatológica e morfologia da cultura primária</i>	65

6.2.3	<i>Tempo de duplicação celular</i>	74
6.2.4	<i>Cariotipagem</i>	75
6.2.5	<i>Imunocitoquímica.....</i>	83
6.2.6	<i>Separação de populações positivas para a atividade de aldeído-desidrogenase (ALDH) através de citometria de fluxo.....</i>	89
6.2.7	<i>Separação de populações celulares por beads magnéticas através do perfil de expressão de CD24/CD44</i>	98
7	DISCUSSÃO	104
8	CONCLUSÃO	116
9	REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo a segunda maior causa de morte, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Para 2030, estima-se que a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. Durante décadas, a pesquisa minuciosa das bases moleculares do câncer vem tentando esclarecer as causas da transformação oncogênica e o aparecimento de neoplasias ainda não detectáveis.

Principalmente para tumores sólidos, como é o caso do câncer de mama, a heterogeneidade e a complexidade molecular impõem muitos desafios para o desenvolvimento de estratégias efetivas para a prevenção e a cura desta doença. Neste contexto, há um grande investimento nas pesquisas que buscam entender e desvendar a origem dos tumores, e entre elas, se encontra a teoria das células-tronco cancerosas, onde apenas um grupo de células seria capaz de dar origem a um novo tumor, além da mediação das vias de metástase e falhas na quimioterapia. Se correta, pode fornecer informações valiosas que explicariam muitas das limitações encontradas nos modelos atuais, sugerindo novas estratégias para o controle das neoplasias mamárias. Por causa da estreita relação entre CITs com a iniciação, progressão, metástase e resistência às terapias, técnicas de isolamento, identificação e caracterização destas células para compreensão da biologia celular e molecular, devem ser cada vez mais precisas para continuar os avanços na pesquisa em câncer. Assim, temos de levar em conta os benefícios que a investigação na oncologia comparada pode oferecer não só para a saúde animal, mas também à medicina humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITOS GERAIS SOBRE CÂNCER

O termo “câncer” pode ser considerado como um termo genérico, o qual abrange um grupo de doenças de diferentes etiologias, características e implicações que acometem qualquer parte do organismo. É definido pela proliferação descontrolada de células que ultrapassam seus limites usuais e podem interferir não só na arquitetura e função do próprio tecido de origem, mas também em tecidos adjacentes a ele, seja por compressão física ou invasão de células tumorais (KUMAR, 2011). Neste último processo, as células neoplásicas podem alcançar e invadir vasos sanguíneos e linfáticos, disseminando-se para outras regiões e implantando-se em um segundo tecido, dando origem a uma neoplasia secundária. Esta evolução é conhecida como processo de invasão e formação de metástases. Neste processo, segundo a Sociedade Americana do Câncer (ACS – *American Cancer Society*), que é responsável por quase 90% das mortes pela doença no mundo, as células do tumor primário adquirem algumas habilidades que permitem com que estas células invadam a matriz extracelular. Para isso, é preciso que haja uma ação concomitante entre estes dois componentes: as células primárias necessitam selecionar as características vantajosas a elas, e a matriz extracelular deve apresentar componentes que permitam a adaptação e acomodamento destas células para que aconteça o desenvolvimento da nova formação (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

O câncer é uma das doenças que mais desafiam a medicina não só pela complexidade no seu desenvolvimento, mas também pela dificuldade do tratamento, raramente eficaz. Apesar dos grandes avanços realizados pela medicina quanto ao diagnóstico e tratamento, seja na oncologia da pesquisa básica, ou na oncologia clínica aplicada, ainda nos confrontamos com um alto índice de incidência e mortalidade causado pelo câncer em todo o mundo, sendo que estes números alarmantes não ficam restritos a uma determinada raça, idade, sexo ou condição social. Segundo estatísticas da IARC (*International Agency for Research on Cancer* – pertencente à Organização Mundial da Saúde), em 2012 foram registrados 14,1

milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes pela doença, e mais de 32 milhões de pessoas vivendo com a doença no mundo (Quadro 1), (GLOBOCAN, 2012). Para 2025, a tendência é um aumento do número de casos: levando em consideração somente as projeções das mudanças demográficas mundiais, estima-se que 19 milhões de casos sejam diagnosticados em homens e mulheres. As mudanças na fertilidade e o aumento na expectativa de vida acabam por levar a uma rápida expansão e envelhecimento da população mundial, atingindo uma escala indesejável de problemas relacionados ao câncer, principalmente em países em desenvolvimento (Figura 1) (ACS; IARC, 2014).

Quadro 1 - Incidência e mortalidade do câncer no mundo

Número estimado (x 1000)	Homens			Mulheres		
	Casos	Mortes	5-anos prev.	Casos	Mortes	5-anos prev.
Mundo	7427	4653	15362	6663	3548	17182
Regiões mais desenvolvidas	3244	1592	8616	2832	1287	8297
Regiões menos desenvolvidas	4184	3062	6747	3831	2261	8885
	Ambos					
	Casos	Mortes	5-anos prev.			
Mundo	14090	8202	32545			
Regiões mais desenvolvidas	6076	2878	16913			
Regiões menos desenvolvidas	8014	5323	15632			

Fonte: International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde

Legenda: Em números, 57% dos casos novos, 65% das mortes pela doença e 48% casos prevalentes ocorreram em regiões menos desenvolvidas – 2012

É sabido que alguns órgãos são mais propensos a desenvolver uma neoplasia do que outros, apresentando uma maior incidência e prevalência no cenário atual. Dos 14 milhões de casos diagnosticados, a maior incidência é neoplasias pulmonares, seguido de por neoplasias mamárias, colorretais, de próstata, estômago e fígado. Este quadro não difere muito entre ambos os sexos. Nas mulheres, a neoplasia responsável pelo maior número de mortes ainda é o câncer de mama, seguido das neoplasias de pulmão, colorretal, cérvix, estômago e fígado; em homens, o principal órgão é o pulmão, seguido de fígado, estômago, câncer colorretal e câncer de próstata (Gráficos 1 e 2).

Figura 1 - Incidência e mortalidade de câncer no âmbito mundial

Fonte: International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde.

Legenda: Para mortalidade há uma menor variabilidade regional, com o índice chegando a ser 15% maior nos homens, e 8% em mulheres em países desenvolvidos, do que nos subdesenvolvidos

Gráfico 1 - Incidência registrada de câncer na população mundial, homens e mulheres - 2012

Fonte: International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde

Gráfico 2 - Mortalidade registrada na população mundial, homens e mulheres - 2012

Fonte: International Agency for Research on Cancer. Organização Mundial da Saúde

No Brasil, também é evidente que o câncer é um problema grave de saúde pública, onde falta assistência para o controle e prevenção da doença não só nas regiões mais pobres, mas também abrangendo todos os níveis culturais e sociais da população. O Brasil é um país em desenvolvimento, e deste modo também se encontra na fase de mudanças quando se fala em perfil demográfico. Assim como no resto do mundo, a melhora, mesmo que pequena e lenta, nas políticas de saúde e outras políticas públicas, tem levado a um envelhecimento da população brasileira, onde se tem como consequência uma diminuição na mortalidade por doenças infectocontagiosas e um aumento na incidência e prevalência das doenças crônico-degenerativas (Figura 2) (INCA, 2014).

Deste modo, adicionado ao fato de que o câncer se trata de uma doença multifatorial e não só uma desordem causada por um agente específico, medidas preventivas devem ser continuadas para tentar-se o controle e a redução dos casos de câncer. Medidas tais como as estratégias para o controle do tabagismo, o estímulo da alimentação e hábitos de vida mais saudáveis, a vacinação para prevenção do câncer de útero pelo Papilomavírus humano (HPV), a diminuição no consumo de álcool, conscientização sobre métodos de prevenção contra melanoma, entre outros métodos, devem entrar na rotina das campanhas nacionais contra o câncer. Estas medidas crescem em importância especialmente para nações como o

Brasil, que se encontram não só neste processo de transição demográfica, mas também em uma condição de transição econômica, o que conseqüentemente leva ao ônus global do câncer observado em países economicamente mais desenvolvidos (INCA, 2014).

A distribuição das neoplasias por órgãos/sistemas e sexos no Brasil difere um pouco quando comparada ao resto do mundo. Por exemplo, em homens, que nas estatísticas mundiais têm como principal tipo de câncer o carcinoma pulmonar, no Brasil, mais de 20% dos casos diagnosticados até 2014 foram de câncer de próstata, e mais de 68 mil novos casos são estimados para 2015, sendo a neoplasia mais incidente em todas as regiões do país. Logo depois, estão as neoplasias de sistema respiratório (traqueia, brônquio e pulmão), cólon e reto, estômago, entre outras. Nas mulheres, apesar do câncer de mama também liderar a lista de incidência e mortalidade por câncer no país (20,8% dos casos) assim como nas demais regiões do mundo, neoplasias de cólon e reto, colo do útero, tireóide e ovário ganham espaço notável nas estatísticas brasileiras (Quadro 2) (INCA, 2014).

Quadro 2 - Estimativa dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não-melanoma - 2014

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer

Figura 2 - Representação das taxas brutas de incidência por 100 mil indivíduos, em homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014

Fonte: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer

Legenda: estão representadas as taxas por estados da Federação, de todas as neoplasias malignas exceto as de pele não-melanoma - 2014

Todos os dados de taxas de incidência e estimativas de novos casos de câncer no Brasil para o biênio 2014/2015 foram retirados das publicações realizadas pelo Instituto Nacional Do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. Sabe-se que estimativas e projeções são importantes para a descrição e entendimento dos padrões atuais de incidência de câncer, e, apesar das limitações, permitem o dimensionamento do impacto desta doença no Brasil e no mundo, assessorando na tomada de decisões a fim de reduzir cada vez mais os números dos próximos levantamentos.

2.2 NEOPLASIAS MAMÁRIAS

O diagnóstico, prognóstico e tratamento para o câncer de mama é uma das áreas que mais progride em pesquisas e resultados na oncologia, principalmente porque esta neoplasia apresenta a maior taxa de incidência e prevalência, e representa a maior causa de mortalidade nas mulheres em todo o mundo. Segundo a IARC, a estimativa para o ano de 2012 era de cerca de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados, representando 25% de todas as neoplasias (Figura 3)

(GLOBOCAN, 2012). No Brasil a situação não é diferente. Para 2014/2015, são esperados 57.120 novos casos de câncer de mama, sendo o risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres, somando-se os dados de todos os estados (Figura 4). As taxas de mortalidade são desiguais entre as regiões, sendo que as áreas de melhor situação socioeconômica têm uma leve tendência à diminuição e estabilidade, enquanto que aquelas com uma pior condição socioeconômica apresentam uma maior probabilidade de aumento dos índices de mortalidade com o passar do tempo. No entanto, a sobrevida de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no Brasil compara-se com a de países desenvolvidos, como a Inglaterra. A sobrevida em um, cinco e vinte anos publicada para as britânicas é de 95%, 85% e 64%, respectivamente, enquanto que no Brasil, a sobrevida estimada é de aproximadamente de 80% em cinco anos (INCA, 2014).

É a neoplasia mais comum tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, com uma leve tendência a um aumento nos países de baixa e média renda, novamente explicado pelo envelhecimento da população, urbanização, hábitos de vida mais saudáveis e melhoria nas práticas de diagnóstico. Recursos limitados com sistemas de saúde ineficientes, onde a incidência de câncer de mama é relativamente baixa e a maioria das mulheres são diagnosticadas em estágios avançados, têm a opção de implementar programas de diagnóstico precoce com base no conhecimento dos sinais e sintomas pelas próprias mulheres, e encaminhamento imediato para diagnóstico e tratamento. A detecção precoce, a fim de melhorar os resultados do câncer de mama e de sobrevida após o diagnóstico continua a ser a base do controle desta neoplasia.

Figura 3 - Taxas de incidência do câncer de mama em mulheres na população mundial

Fonte: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer

Nota: as taxas de incidência são ajustadas para uma taxa de idade padronizada (ASR, do inglês *age-standardised rate*), necessárias quando se faz a comparação entre grupos onde a idade é um fator que influencia nos resultados. A ASR é uma média ponderada das taxas específicas por idade; os pesos são retirados da distribuição da população padrão.

Figura 4 - Taxas brutas de incidência, em 100 mil mulheres, de neoplasias malignas de mama estimadas para o ano de 2014

Fonte: Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer

Já se sabe que alguns fatores são considerados de risco para o desenvolvimento de um tumor mamário primário. Elementos como: mutações genéticas herdáveis bem definidas, como nos genes BRCA1 e BRCA2 (KING; MARKS; MANDELL, 2003; WALSH; KING, 2007); número de gestações e idade ao primeiro parto (LORD et al., 2008); obesidade e o risco associado de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa (CLEARY; GROSSMANN, 2009), podem estar relacionados com uma maior ou menor probabilidade de um indivíduo, no caso uma mulher, vir a apresentar um nódulo em que se confirme o diagnóstico de neoplasia mamária. Mas, mesmo com algumas vias destes elementos já bem definidas pela ciência, ainda não podemos predizer com certeza quem um dia desenvolverá um câncer, e quem nunca apresentará a doença.

A soma dos diversos fatores de risco, estes sujeitos a modificações e sem considerar os fatores reprodutivos, foi avaliada por Danaei et.al. (2005). Depois de correlacionar diversos tipos de câncer a nove fatores de risco diferentes, chegaram à conclusão de que mais de 20% de todas as mortes causadas por neoplasias mamárias no mundo estão relacionadas ao consumo excessivo de álcool e da obesidade, consequência do excesso de peso, falta de atividades físicas, ou de ambos os fatores associados (DANAELI et al., 2005). Isto demonstra que a redução da exposição aos principais fatores de risco comportamentais e ambientais impediria uma substancial proporção de mortes por câncer no mundo.

Clinicamente, é uma doença tipicamente heterogênea, que pode ser categorizada de diversas formas. O que normalmente é feito, é a classificação destas neoplasias de acordo com a apresentação histológica, e posteriormente, através da expressão ou não de marcadores tumorais, divididos em três principais grupos: o das neoplasias que apresentam receptores de estrógeno e/ou progesterona positivos (ER/PR), sendo o grupo mais variado e numeroso; aqueles que são positivos para receptores da proteína HER2, o qual representa o grupo de maior sucesso terapêutico devido à eficácia da terapia direcionada a este gene; e o grupo dos cânceres triplo-negativos (*Triple-negative Breast Cancers* – TNBCs), onde a célula cancerosa não responde a nenhum dos três receptores anteriores, sendo considerado o mais maligno pela ineficiência terapêutica quando tratados com medicamentos utilizados no tratamento dos demais grupos (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Este último subtipo compreende em torno de

20% dos tumores mamários, ressaltando a deficiência na compreensão das vias que regem a progressão tumoral, desfavorecendo assim o prognóstico das pacientes dada a propensão para recidivas e metástases. (HURVITZ; FINN, 2009).

Histologicamente, os dois tipos mais frequentes são o carcinoma ductal e o carcinoma lobular, representando cerca de 75% e 15% de todas as neoplasias mamárias em mulheres, respectivamente (LI; URIBE; DALING, 2005; KORHONEN et al., 2013). Os carcinomas lobulares apresentam parâmetros mais favoráveis, como a positividade de receptores hormonais, baixos graus histológicos, baixos índices proliferativos, apesar de com frequência apresentarem mais negatividade para receptores HER2 quando comparados com os carcinomas ductais (DIXON; ANDERSON; PAGE, 1996; ARPINO et al., 2004; RAKHA et al., 2008). Há um interesse especial no estudo dos carcinomas lobulares, pois mesmo mostrando características mais brandas do que os ductais, dados americanos salientam para o rápido aumento nas taxas de incidência deste tumor em um intervalo de tempo relativamente pequeno: de 1987 a 1999, enquanto a incidência de carcinoma ductal subiu apenas 3%, as taxas de carcinoma lobular tiveram um aumento de 65% no mesmo período, provavelmente relacionado ao uso de hormônios para reposição pós-menopausa, e às melhorias nas técnicas de diagnóstico (LI et al., 2003).

Vários estudos vêm se dedicando a entender a diferença epidemiológica e na progressão entre estes, que consistem nos dois principais subtipos. Muito menos se sabe sobre os tipos histológicos mais raros, que inclui os carcinomas tubulares, mucinosos, comedos, inflamatório, medulares, e carcinomas papilíferos, que juntos respondem a cerca de 10% de todos os casos (LI; URIBE; DALING, 2005). Mesmo com tantos avanços científicos, ainda há muito que se entender sobre o desenvolvimento e progressão dos tumores sólidos, principalmente mamários, visando sempre a prevenção, diagnóstico precoce, eficiência no tratamento e qualidade de vida das pacientes.

2.3. MODELOS DE DESENVOLVIMENTO NEOPLÁSICO

A origem e a organização do câncer vêm sendo muito discutida atualmente, uma vez que os pesquisadores ainda não conseguiram explicar como se desenvolve a heterogeneidade característica das neoplasias, principalmente em tumores sólidos. Hoje, teorias demonstram que células progenitoras ou mesmo células-tronco teciduais seriam passíveis de uma transformação genética, podendo assim dar início ao desenvolvimento neoplásico (WANG, 2010). Na tentativa de entender como a fase de iniciação do câncer acontece, e qual seria a forma com que estas células evoluem até os primeiros indícios de malignidade, dois modelos de desenvolvimento tumoral foram sugeridos: o primeiro, chamado de modelo estocástico ou modelo de expansão clonal, diz que a origem do câncer seria a partir de mutações nas próprias células somáticas, e o consequente descontrole na proliferação permitiria a aquisição de clones que sofreriam transformações que levariam à malignidade; e o segundo, o modelo hierárquico, onde o desenvolvimento de um tumor se daria através da propagação de células menos diferenciadas, como as células-tronco, que teriam a capacidade de se diferenciar em células neoplásicas mais especializadas, bem como se utilizaria de mecanismos para manter este potencial sempre ativo, evitando a senescência e escapando da morte celular (Figura 5). Há ainda modelos recentes que englobam ambos tipos de desenvolvimento, onde novas mutações somáticas poderiam gerar diversidade clonal, aumentando ainda mais a heterogeneidade tumoral (GREAVES; MALEY, 2012; BECK; BLANPAIN, 2013)

2.3.1 Modelo estocástico de desenvolvimento neoplásico

O modelo de desenvolvimento estocástico (ou de expansão clonal) foi proposto por Peter Nowell em 1976, e sugere uma teoria para a evolução das populações de células tumorais, a qual teria como principal característica uma variação genética por etapas, podendo ser válido para a maioria das neoplasias de mamíferos. Assim, uma célula, ou um pequeno grupo de células normais sofreriam

uma transformação pela ação de um agente carcinogênico, promovendo uma proliferação desregulada, e as células-filhas geradas acabariam por obter alguma vantagem sobre as demais células adjacentes, dando origem a uma expansão clonal (Figura 5). A intensa multiplicação causaria uma instabilidade genômica celular, permitindo uma série de mutações e reestruturações nos cromossomos. Este acúmulo de mutações, então, daria origem a um novo fenótipo de células, mais resistente e mais apto à sobrevivência, enquanto que, aquelas que não adquiriram estas características, morreriam pela ação da imunidade própria do organismo hospedeiro ou alterações metabólicas que desfavoreceriam a sobrevivência das mesmas (NOWELL, 1976). O modelo estocástico então, se baseia em etapas de transformações celulares, onde em cada fase se tem uma população dominante sobre as outras. Este conjunto de ideias se assemelha ao conceito de seleção natural descrito por Charles Darwin, em que o sistema de evolução é a variabilidade genética ao acaso dos indivíduos unidos por um ancestral comum, juntamente com a seleção natural dos mais aptos (GREAVES; MALEY, 2012).

Vários indícios podem dar suporte à teoria da expansão clonal. O primeiro deles está relacionado ao tempo que um tumor leva até o aumento visível de tamanho, sugerindo que as células tumorais passariam por um período de estase. Em cada estágio do desenvolvimento neoplásico, segundo o modelo estocástico, haveriam fatores, principalmente envolvidos com o microambiente tumoral (arquitetura, recursos, fatores de crescimento, etc) ou mesmo fatores externos como a quimio e radioterapia, que limitariam o crescimento de todas as células em geral, conduzindo a uma competição inerente ao ambiente que seleciona apenas as mais resistentes para darem continuidade à progressão. Assim, muitas, se não a maioria, das células tumorais morreriam antes mesmo de concluir a multiplicação. Este fato é evidenciado pelas grandes taxas de lesões pré-malignas como carcinomas *in situ*, fase de dormência do câncer, aumento lento e gradativo no tamanho macroscópico da lesão, e reconstituição genética das semelhanças entre os clones (MALAISE; CHAVAUDRA; TUBIANA, 1973; AGUIRRE-GHISO, 2007; REID et al., 2010).

Figura 5 - Modelo de desenvolvimento de tumores sólidos a partir da expansão clonal proposta por Nowell.

Fonte: adaptado de Greaves & Maley. **Nature Reviews**. v. 481. 2012

Legenda: subpopulações de células neoplásicas são selecionadas pelos fatores extrínsecos e intrínsecos a elas, as mais aptas sobrevivem, as outras morrem ou continuam dormentes. Os quadros em cinza representam os ecossistemas, enquanto que as linhas demonstram o momento da pressão seletiva.

Um exemplo prático seria a progressão que ocorre de forma comum em neoplasias mamárias: uma neoplasia benigna, bem diferenciada, provavelmente causada por um reduzido número de mutações, com o tempo começa a apresentar um fenótipo mais maligno, como os carcinomas *in situ*, que apesar de menos diferenciados ainda são de baixo grau invasivo; e por fim, as células tumorais invadem tecidos adjacentes e vasos, causando a metástase - progressão de hiperplasia glandular, para adenoma, carcinoma e invasividade. Mais do que simples mutações e transformações genéticas a cada estágio da evolução clonal, as populações celulares que estariam no controle do desenvolvimento tumoral estão sujeitas a alterações fenotípicas desencadeadas por mudanças epigenéticas (GREAVES; MALEY, 2012). Estas mudanças incluem alterações globais, como

hipometilações do DNA e hipoacetilações da cromatina levando a uma instabilidade genômica e a desregulação gênica do retinoblastoma e p16, por exemplo, bem como mudanças mais específicas, assim como hipometilação e hipermetilação de oncogenes e genes supressores tumorais, respectivamente (HODGSON et al., 2003; FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006; JONES; BAYLIN, 2007).

Desde modo, propõe-se que a maioria dos neoplasmas surgem a partir de uma única célula de origem, e os resultados de progressão tumoral e a variabilidade genética adquirida dentro do clone original permite a seleção sequencial de subclones mais agressivos. Populações de células tumorais são, aparentemente, geneticamente mais instáveis do que as células normais, talvez pela ativação de um loci específico na neoplasia, pela presença contínua do carcinógeno, ou mesmo deficiências de recursos intratumoral.

2.3.2 Modelo hierárquico ou teoria das Células-tronco Cancerosas

Por outro lado, o modelo hierárquico sustenta a hipótese que o câncer se desenvolve a partir de uma única subpopulação presente na massa tumoral. A teoria das células-tronco cancerosas (CSCs, do inglês *Cancer Stem Cells*) propõe um grupo de células contidas nos tumores sólidos as quais compartilham de algumas similaridades com as células-tronco encontradas nos tecidos embrionários e tecidos adultos saudáveis, como por exemplo, o potencial de auto-renovação, e a capacidade de diferenciação em células mais especializadas, contribuindo para a manutenção da neoplasia (Figura 6) (BECK; BLANPAIN, 2013). É preciso esclarecer que o termo “célula-tronco cancerosa”, ainda gera confusão, uma vez que muitos interpretam o termo no sentido de que tais células derivam das células-tronco do tecido correspondente. As células-tronco no câncer podem, de fato, surgirem a partir de células-tronco normais através de mutações em genes que tornariam as células-tronco cancerosas, mas isto pode não ser o caso em todos os tumores. Por isso, adotou-se também a expressão Células Iniciadoras de Tumor (CITs), que seriam populações celulares capazes de dar início a uma nova neoplasia, mas não é necessariamente uma célula-tronco.

Figura 6 - Modelos de desenvolvimento neoplásico.

Fonte: adaptado de Dick. *Stem cell concepts renew cancer research*. **Blood**, v. 112. 2008

Legenda: O tumor é composto por grupos distintos de células, biologicamente e funcionalmente. No modelo estocástico, as populações mais resistentes sobreviveriam à pressão seletiva, mas células de fenótipos variados poderiam dar origem a um novo tumor. Ao contrário, no modelo hierárquico, apenas um grupo de células teria a capacidade de se auto-renovar e dar origem aos demais grupos, e esta população poderia ser selecionada através de um fenótipo único.

O primeiro relato de isolamento destas células foi realizado na década de 90 em casos de leucemia mielóide aguda, onde Dominique Bonnet e John Dick identificaram células-tronco normais e cancerosas, e caracterizaram ambos os grupos quanto ao fenótipo e à capacidade de cada um deles no crescimento neoplásico em camundongos imunodeficientes (BONNET; DICK, 1997). Neste trabalho, os autores notaram que as leucemias mielóides poderiam responder ao modelo hierárquico, onde uma única subpopulação celular, no caso as células-tronco leucêmicas, se encontra no topo desta hierarquia. Quando transplantadas, as células-tronco tumorais seriam biologicamente distintas, e se manteriam por si só, gerando clones que se diferenciam ou geram progênie que irão adquirir fenótipo e

propriedades parecidas com as de células-tronco normais levando a progressão do tumor (DICK, 2008).

A origem das CSCs depende da localização em que irá desenvolver o tumor inicial. Assim como em tecidos normais, as CSCs estão dispostas em nichos, que são localizações anatômicas específicas responsáveis pela proteção, manutenção dentro do microambiente tumoral e sustentação das condições ideais para que elas mantenham suas características (LI; XIE, 2005; SCADDEN, 2006). Acredita-se também que as CSCs seriam as responsáveis não só por conduzir o crescimento do tumor, mas também por sua capacidade superior de invasão, através de um mecanismo já definido chamado de transição epitélio-mesenquimal (EMT), além de proporcionar uma maior resistência contra a quimioterapia (HUNTLY; GILLILAND, 2005; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008; VISVADER; LINDEMAN, 2008).

As células tumorais associam-se a mecanismos fisiológicos para se proteger de agentes tóxicos, o que corresponde a uma significativa barreira na realização de um tratamento quimioterápico efetivo (GOTTESMAN, 2002). Este mecanismo é mediado principalmente por uma família de proteínas transportadoras ATP-dependentes conhecida como transportadores ABC (*ATP-binding Cassette*), que formam um sistema de efluxo de substâncias altamente eficientes, conhecido como mecanismo de resistência a múltiplas drogas, ou MDR – do inglês *Multi-drug Resistance*. O avanço da biologia molecular levou à identificação dos principais genes MDRs, através da suspeita de que esta resistência estaria associada a produtos de genes capazes de alterar a membrana plasmática (RONINSON et al., 1984). E descobriu-se que os principais genes, e por consequência, as principais proteínas responsáveis pelo efluxo de substâncias quimioterápicas para o meio extracelular eram a ABCB1 e ABCG2, membros de uma família de 48 proteínas conhecidas, responsáveis por uma série de processos essenciais para a sobrevivência da célula tumoral (TWENTYMAN; FOX; BLEEHEN, 1986; DOYLE et al., 1998; DONNENBERG; DONNENBERG, 2005).

Tanto o ABCB1 quanto o ABCG2 também são expressos em células-tronco, não só auxiliando no efluxo de agentes tóxicos, mas também protegendo o tecido contra a morte celular independentemente da administração de qualquer tipo de agente externo (SIMS-MOURTADA et al., 2007). O conhecimento do papel central

de que os transportadores MDR atuam na proteção das células-tronco normais nos permite refinar a hipótese das células-tronco cancerosas, e adicionar novos pontos de vista que podem ser relevantes para explicar o fracasso dos tratamentos quimioterápicos, recidivas tardias, metástases, e as diferentes respostas que os tipos histológicos apresentam na apresentação geral do câncer. Tal conhecimento também é de grande valia para a projeção de terapias inovadoras, que levem em conta as semelhanças e diferenças entre o câncer e as células-tronco normais (DONNENBERG; DONNENBERG, 2005).

Do mesmo modo, a transição epitélio-mesenquimal é fundamental para o sucesso das neoplasias invasivas e malignas. Consiste na remodelação do citoesqueleto celular, passando de uma estrutura epitelial e estável para um fenótipo mesenquimal e de alta motilidade, capaz de passar por entre a matriz extracelular e chegar até os vasos sanguíneos e linfáticos. Uma vez nos vasos, as células invasoras alcançam um sítio metastático, onde novamente ultrapassam a barreira de células endoteliais, e se instalam no tecido-alvo, retornando à forma epitelial e dando origem a um tumor secundário (Figura 7). Entre todos os eventos de EMT associados com metástases, um dos mais importantes é a perda de proteínas responsáveis pela adesão célula-célula, como por exemplo, a E-caderina e citoqueratina, e o aumento da expressão de vimentina e N-caderina. A E-caderina e N-caderina são proteínas que desempenham um papel importante no estabelecimento e manutenção da arquitetura celular, polaridade celular e diferenciação (VAN ROY; BERX, 2008), enquanto que a citoqueratina, assim como a vimentina, compõe um dos filamentos intermediários estruturais que mantêm a morfologia da célula (BERNAL; STAHEL; BAYLIN, 1985). Nos seres humanos, estudos já demonstraram que a perda de E-caderina e citoqueratina desencadeia uma disseminação metastática em diversos tipos de tumores, bem como um aumento do crescimento, invasão e resistência a drogas de células de câncer colorretal com metástases hepáticas associadas (ONDER et al., 2008). Estudos recentes também indicam que a EMT está fortemente associada à MDR (JIANG et al., 2015), portanto, o aumento da motilidade celular permitiria a resistência a agentes citotóxicos, senescência, bem como o escape do sistema imunológico e fármacos quimioterápicos, desenvolvendo e induzindo metástases (KAJIYAMA et al., 2007; ZHANG; MA, 2012).

Figura 7 - Transição epitélio-mesenquimal (EMT) e transição mesenquima-epitelial (MET) para formação de tumor secundário

Fonte: adaptado de Thompson & Haviv. *The social aspects of EMT-MET plasticity*. **Nature Medicine**, v 11. 2011.

Legenda: transição epitélio-mesenquimal (EMT) seguida de extravasamento e transição mesenquima-epitelial (MET) para formação de tumor secundário em tecido distante

Embora as células-tronco dos vários tecidos vivos apresentem propriedades fundamentais de auto-renovação e diferenciação, o local de origem pode influenciar a atividade de cada uma (CLARKE et al., 2006). Por isso, marcadores celulares que são úteis na caracterização de células iniciadoras em um determinado tipo de tumor, podem não ter a mesma eficiência em outro. Além disso, poucos marcadores que são utilizados para o isolamento de células-tronco cancerosas são expressos exclusivamente por elas. Por exemplo, o marcador de membrana CD133⁺ é amplamente usado para isolar populações enriquecidas com CSCs em tumores cerebrais, hepáticos, prostáticos, pancreáticos e colorretais (SINGH et al., 2003; COLLINS et al., 2005; SUETSUGU et al., 2006; HERMANN et al., 2007; O'BRIEN et al., 2007), mas também está presente no cérebro saudável e em células diferenciadas de diversos tecidos do corpo. Também, já foi verificado que tanto

populações CD133⁺ quanto CD133⁻ foram capazes de gerar tumores em camundongos imunodeficientes (SHMELKOV et al., 2008).

O mesmo acontece com marcadores comumente utilizados no câncer de mama, como o CD44 e o CD24. O primeiro é uma glicoproteína transmembrana expressa em diversos tipos celulares, e está envolvido nas interações célula-célula bem como em uma série de interações com a matriz extracelular em diversos tecidos. O segundo, também é um marcador de membrana expresso em neutrófilos, pré-linfócitos B e em alguns tipos de células tumorais (FOGEL et. al., 1999). O fenótipo mais utilizado para o isolamento de populações enriquecidas com CSCs em neoplasias mamárias corresponde ao grupo CD24^{-/low}/CD44⁺, mas alguns trabalhos já demonstraram que apenas estes dois marcadores podem não ser suficientes para a separação desta população (AL-HAJJ et al., 2003; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008). Além disso, em tumores altamente agressivos, como é o caso do comedocarcinoma mamário, o fenótipo CD24⁺/CD44⁺ também foi caracterizado como tumorigênico (AL-HAJJ; CLARKE, 2004). Isso mostra a dificuldade na caracterização de uma molécula que seja expressa de forma semelhante e possa ser utilizada fielmente em todos os tipos de neoplasias. Então, considerando que as CSCs seriam as únicas células capazes de metastatizar e colonizar tecidos distantes, e que, também são as células que apresentam uma maior resistência a fármacos e um alto metabolismo detoxificante, o desenvolvimento de terapias-alvo de inibidores de EMT pode proporcionar novas estratégias para a prevenção, diagnóstico e tratamento de câncer.

2.4 CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS NO CÂNCER DE MAMA

Uma grande variedade de células compõe o tecido glandular mamário, como as células epiteliais, estromais, hematopoiéticas e endoteliais. Também, a mama representa um importante nicho de células-tronco sadias, que estão presentes em um número constante (DONTU et al., 2003). Além do potencial de auto-renovação, elas têm a capacidade de gerar os três grupos celulares que compõe a estrutura lóbulo-alveolar de um tecido mamário adulto: células mioepiteliais que formam o

estrato basal dos ductos e alvéolos; células epiteliais ductais, que limitam o lúmen dos ductos; e células epiteliais alveolares que sintetizam as proteínas do leite (LI; XIE, 2005). Apresentam-se quiescentes no tecido a menos que haja algum estímulo, como por exemplo, a chegada da puberdade ou a ocorrência da gravidez. Ao contrário dessas alterações, que são breves e pontuais, o ciclo reprodutivo feminino está presente em boa parte da vida destes indivíduos, expondo a mulher a uma constante taxa de hormônios que por sua vez possuem uma grande influência na glândula mamária, alterando a homeostasia das células-tronco mamárias (MaSC) e consequentemente aumentando a predisposição a incidência de neoplasias malignas (SHACKLETON et al., 2006).

Em 2003, baseando-se nos métodos utilizados nos estudos envolvendo leucemias murinas, o grupo de Michael Clarke demonstrou a existência de uma população celular tumorigênica peculiar no câncer de mama, que apresentaria uma marcação similar às células-tronco teciduais normais (fenótipo $CD44^{+}/CD24^{low-}/Lin^{-}$). Esta subpopulação exibia propriedades semelhantes às células-tronco encontradas nos tecidos saudáveis: teriam potencial de auto-renovação, levariam à tumorigenicidade, recidivas e metástases, além de apresentarem a capacidade de se diferenciar em outros tecidos, embora aberrantes, dando origem à heterogênea população de células tumorais (AL-HAJJ et al., 2003). Outros trabalhos alcançaram resultados semelhantes desde então, se utilizando de diversas ferramentas e marcadores para separação das populações (Quadro 3), mostrando que a grande parte das células que constituem a massa tumoral, não seriam tumorigênicas devido a falta da capacidade de auto-renovação e limitado potencial de proliferação (Quadro 4) (PONTI et al., 2005; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008). Além de marcadores de membrana, outros métodos descrevem potenciais formas de isolamento das populações de CSCs. A ALDH por exemplo, é uma enzima responsável pela conversão de aldeídos em ácidos carboxílicos. É necessária na produção de ácidos retinóicos e pode desempenhar um papel na regulação da diferenciação de células-tronco hematopoiéticas, neurais e mamárias e, em seres humanos, o elevado nível de atividade de ALDH é uma característica comum de CSCs em tumores de mama, pulmão e pâncreas (CHUTE et al., 2006; GINESTIER et al., 2007; JIANG et al., 2009; RASHEED et al., 2010).

Quadro 3 - Marcadores de células-tronco cancerosas em tumores sólidos

ABCG2

Membro da família ATP, envolvida no transporte de esteróides e outros lipídeos. ABCG2 (também conhecida como proteína de resistência do câncer de mama) é um transportador de múltiplas drogas (ver abaixo Hoechst SP). ABCG5 confere resistência à doxorubicina.

ALDH1

A aldeído desidrogenase (ALDH) de família de enzimas catalisam a oxidação de aldeídos alifáticos e aromáticos de ácidos carboxílicos. ALDH1 tem um papel na conversão de retinol para o ácido retinóico, que é importante para a proliferação, diferenciação e sobrevivência.

CD24 (HSA)

Molécula de adesão glicosilfosfatidilinositol pesadamente glicosilada, que tem um papel co-estimulador nas células B e T. O único ligante conhecido para a P-selectina. Embora não seja um marcador específico de células-tronco cancerosas, níveis baixos podem caracterizar células iniciadoras de tumor na mama

CD44 (PGP1)

Molécula de adesão com múltiplas isoformas que tem papéis pleiotrópicos em sinalização, migração e homing. A forma CD44H padrão exibe uma elevada afinidade para o hialuronato; CD44V confere propriedades metastáticas.

CD133 (prominin 1)

Glicoproteína de domínio transmembranar com um papel na organização da topologia da membrana plasmática. Expressa em células-tronco e progenitoras CD34+ no fígado fetal, precursores endoteliais, células-tronco neuronais fetais e do desenvolvimento de epitélio, CD133 foi detectada pelo epítipo glicosilado na maioria dos estudos. Assim, pode ser um marcador de células-tronco cancerosas mais confiável

EpCAM (molécula de adesão das células epiteliais; ESA, TROP1)

Molécula de adesão celular homofílica Ca^{2+} independente expressa nas superfícies basolaterais da maioria das células epiteliais

Side Population (SP)

Fenótipo devido ao efluxo de Hoechst33342 por bombas presentes na membrana plasmática em diferentes tipos de células. Atividade é conferida pelo transportador ABCG2. Inibida por verapamil.

Fonte: adaptado de Visvader & Lindeman. **Nature Review**, v 8. 2008

Quadro 4 - Prospecção do isolamento de células-tronco de tumores mamários humanos de tecidos frescos dissociados

Tumor	Marcador	Células tumorais expressando o marcador (%)	Mín. de células expressando o marcador para tumorigênese <i>in vivo</i>	Ref.
Câncer de mama	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}	11-35	200	(AL-HAJJ et al., 2003)
Câncer de mama	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	ND	2000	(YU et al., 2007)
Câncer de mama	ALDH1	3-10	500	(GINESTIER et al., 2007)

Fonte: adaptado de Visvader & Lindeman. **Nature Review**, v 8. 2008

Embora a existência de células-tronco cancerosas em tumores sólidos ser amplamente aceita, não está claro se linhagens celulares derivadas contêm células semelhantes. O estudo de células iniciadoras de tumor em neoplasias mamárias, principalmente em cultivos celulares, oferece a possibilidade de gerar novos alvos que poderiam superar os problemas de resistência aos medicamentos, melhorar a eficácia terapêutica e aprimorar o entendimento do desenvolvimento complexo da doença como um todo.

2.5 ONCOLOGIA COMPARADA

2.5.1 Tumores espontâneos em cães – neoplasias mamárias

A oncologia comparada é uma área de estudo que tem ganhado espaço no cenário da pesquisa, tendo como o principal foco desta especialidade a possibilidade de utilizar modelos animais de neoplasias espontâneas, tais como em cães e gatos, no estudo da iniciação, promoção e progressão de diversos tipos de câncer, bem como no desenvolvimento e aprimoramento de terapias. Diversas espécies de animais já contribuíram para o avanço da medicina, como cavalos, gatos, cães e até

animais menos comuns, como os ferrets (KLEIN et al., 1986; ANTINOFF; HAHN, 2004; SELTENHAMMER et al., 2004; HERSHEY; DUBIELZIG, 2005; SMITH et al., 2014).

O uso de animais de laboratório para identificar o potencial carcinogênico de diversos produtos químicos e outros agentes ligados à iniciação e desenvolvimento de neoplasias teve início há muitas décadas. Dentre as principais vantagens de se ter camundongos, ratos e hamsters como principais meios de estudo *in vivo* em oncologia, estão: semelhanças com os humanos nas respostas a alguns agentes carcinogênicos em diversos aspectos; menores custos de manutenção do biotério, visto que um pequeno espaço físico pode alojar um grande número de animais, aumentando assim a amostragem de cada estudo; o controle do ambiente em que eles vivem, diminuindo a interferência de fatores externos nos resultados de uma avaliação; a possibilidade da criação de linhagens isogênicas, manipulando geneticamente o alvo do estudo para determinadas características biológicas e moleculares, e também diminuindo a variabilidade genética entre indivíduos, minimizando ou até mesmo excluindo os riscos de efeitos não desejáveis em uma determinada experimentação; e o limitado ciclo de vida destes animais, ideal para estudos que exigem resultados rápidos e onde a idade não é um fator determinante, ou muito determinante, nas características e na eficácia do experimento (FRESE; TUVESON, 2007).

Mas apesar disso, muito ainda se discute sobre a extrapolação dos dados obtidos em roedores para o que acontece com os humanos. Há um crescente grupo de evidências experimentais indicando diferenças importantes (genéticas, metabólicas, ontogenéticas, entre outras) entre as espécies de mamíferos na maneira em que o câncer se desenvolve (ANISIMOV; UKRAINTSEVA; YASHIN, 2005). As células murinas requerem menos alterações genéticas e/ou epigenéticas para que haja um descontrole na proliferação que resulte em neoplasias. Então, por necessidade, a progressão tumoral, que em humanos necessita de várias etapas, em roedores acaba sendo muito mais simples, onde estas diferenças na organização das vias regulatórias celulares ditam fortemente diferentes cursos de um tumor (RANGARAJAN; WEINBERG, 2003). Este maior número de vias necessárias para a transformação das células humanas, ou mecanismos de proteção contra a transformação, provavelmente deve ter sido desenvolvido, ou

aperfeiçoado, durante a evolução das espécies. Mas vale lembrar que, apesar de todas as divergências entre iniciação e progressão tumoral, não se pode diminuir a importância da modelagem em roedores para o estudo do câncer em seres humanos; no entanto, os resultados exigem uma interpretação mais cuidadosa antes de confirmar qualquer hipótese.

O cão recebe um destaque especial quando o assunto é a oncologia comparada. Sabe-se que são próximos geneticamente dos seres humanos, fato cientificamente comprovado pela publicação do genoma canino, em 2005 (LINDBLAD-TOH et al., 2005), e ocupa um espaço importante na genômica atual. A posição do cão dentro da árvore evolutiva dos mamíferos faz com que o animal se torne um guia importante para a análise comparativa do genoma humano, gerando uma grande oportunidade de explorar os efeitos da genética quanto à suscetibilidade a doenças, incluindo o câncer, como demonstrado no quadro 5 (LINDBLAD-TOH et al., 2005). Um exemplo da evolução e organização da oncologia comparada foi a criação do *Canine Comparative Oncology e Genomics Consortium*. O grupo foi lançado por pesquisadores clínicos e científicos para proporcionar um ambiente de discussão sobre o desenvolvimento de novas tecnologias, que permitiria o estudo adequado dos casos de câncer canino na biologia e na terapia do câncer humano (KHANNA et al., 2006).

Quadro 5 - Principais características relacionadas ao estudo da espécie *Canis familiaris* na oncologia comparada.

(Continua)

• Cada vez mais os proprietários de cães se preocupam com os cuidados veterinários direcionados aos animais de estimação. Segundo a Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA – <i>American Veterinary Medical Association</i>), em 2007, o gasto em saúde com cães nos EUA foi de aproximadamente 20 bilhões de dólares. Em 2012, os números chegaram a 26 bilhões (AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 2012). Nos últimos anos, há um interesse maior por parte dos proprietários na participação de seus animais em trials, estudos clínicos e laboratoriais, quando o sucesso do tratamento convencional não é alcançado, fortalecendo a pesquisa em oncologia veterinária comparada e translacional e dando uma nova chance ao animal de estimação.

(Conclusão)

- Raças de cães são semelhantes às populações humanas geograficamente isoladas, como os da Finlândia, na Islândia, exceto que o isolamento é mais extremo. Isto oferece uma grande vantagem na busca de genes associados a doenças complexas, que, em teoria, pode ser mais facilmente mapeados utilizando famílias de cães do que famílias humanas (SUTTER; OSTRANDER, 2004).
- Um exemplo do sucesso do mapeamento genético do cão trazendo benefícios à saúde humana, foi o descobrimento de uma mutação pontual causadora da RCND (sigla em inglês para Cistoadenocarcinoma Renal e Dermatofibrose Nodular), um câncer hereditário bem definido em Pastores Alemães, e com forte semelhança a uma desordem multissistêmica em humanos, chamada BHD. O grupo de Lingaas *et. al.* constatou que o mesmo gene pode ser responsável tanto pela doença canina quanto humana, provendo agora um modelo animal de ocorrência natural para o estudo de uma desordem humana rara (LINGAAS *et al.*, 2003).
- Os cães apresentam uma vida útil mais curta que os humanos, porém bem mais longa que os roedores, sendo que a intervenção clínica pode ser estudada ao longo de um período condensado. As taxas de sobrevivência em cães são avaliadas em um ano, ao invés de cinco como na oncologia humana. Com isso é possível obter resultados relativamente rápidos na realização de ensaios clínicos e no monitoramento da progressão da doença.
- O estudo epidemiológico dos fatores de risco relacionados a doenças complexas humanas, como o câncer, pode também ser acessado através do estudo com cães, uma vez que eles compartilham do mesmo ambiente que seus proprietários e estão expostos a boa parte dos mesmos carcinógenos (KIMURA *et al.*, 2013; SCHALIE *et al.*, 1999). Também, apresentam os mesmos fatores de risco do desenvolvimento de neoplasias, por exemplo, as mamas, que estão associadas a fatores hormonais, obesidade, dieta, entre outros (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005).
- Semelhanças entre as características clínicas e bases moleculares análogas às doenças humanas e caninas, permitem um teste eficaz de novos tratamentos e aprimoramento dos já existentes para doenças humanas, em cães.

Legenda: com o avanço das pesquisas, muitas vantagens são adicionadas nesta área, aumentando os benefícios gerados na saúde humana através dos resultados obtidos principalmente pela genômica e transcriptômica do câncer.

Assim como em seres humanos, os cães desenvolvem tumores de forma espontânea e imprevisível, ganhando destaque na oncologia comparada não só pelas semelhanças anatomofisiológicas com os seres humanos, mas também pelas altas taxas de incidência de câncer nesta espécie: nos Estados Unidos, são estimados mais de um milhão de casos de neoplasias em cães de companhia por ano (PAOLONI; KHANNA, 2008). Dentre os tipos de neoplasia, os tumores mamários são a segunda maior causa de morte, ficando atrás apenas das neoplasias de pele. Em 2012, Gupta e colaboradores compilaram diversas publicações, de 1965 a 2010, em um estudo epidemiológico de neoplasias de mama

em cadelas. Os resultados mostram que a taxa de incidência chega a mais de 45%, e a população canina mais acometida são fêmeas não-castradas de 6 a 14 anos de idade (Gráfico 3) (GUPTA; SOOD; UPPAL, 2012).

Gráfico 3 - Frequência de neoplasias mamárias em fêmeas e distribuição dos casos por idade

Fonte: Gupta et al. IOSR **Journal of Pharmacy**, 2012.

Tumores espontâneos em cães e humanos compartilham uma variedade de recursos, incluindo a aparência histológica, alterações genômicas, alvos moleculares, comportamento biológico e resposta às terapias convencionais (PAOLONI; KHANNA, 2008). Histologicamente, alterações de glândula mamária em cães podem exibir apresentações fortemente heterogêneas, tanto em um único nódulo, quanto entre nódulos diferentes em um mesmo animal. Não é incomum encontrarmos um cão com múltiplos nódulos primários, cada um com uma estrutura histológica distinta (HELLMÉN, 2005). Em 2010, Goldschmidt e seus colaboradores propuseram uma nova classificação para disfunções de glândula mamária em cadelas. Neste trabalho, os autores apresentam mais de 40 possíveis classificações histológicas, variando de uma simples hiperplasia celular, até carcinomas anaplásicos altamente malignos e invasivos, demonstrando o quão complexo este tipo de neoplasia é no seu desenvolvimento e progressão (GOLDSCHMIDT et al., 2011), apresentando uma morfologia complexa na formação de neoplasias epiteliais, mesenquimais e formações mistas (MISDORP et al., 1999). A distribuição entre tumores benignos e malignos é muito semelhante, sendo 50% de neoplasias benignas, com os adenomas complexos, fibroadenomas e tumores mistos benignos, os mais comuns; e 50% de neoplasias malignas, com os carcinomas mistos,

carcinomas complexos e carcinomas anaplásicos no topo da lista dos mais incidentes (HELLMÉN, 2005). A maioria dos tumores mamários mistos são caracterizados por uma mistura complexa de células epiteliais e mioepiteliais, com presença ocasional de metaplasias cartilaginosas, ósseas, ou metaplasias escamosas, e a análise histológica dessas neoplasias geralmente deve incluir também um componente de células fusiformes (CASSALI et al., 2007).

Características como tamanho dos nódulos, tipo histológico, graduação histológica e análise de linfonodos são reconhecidos como fatores prognósticos confiáveis (MISDORP et al., 1999; KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Mas, apesar das neoplasias mamárias malignas representarem metade dos casos diagnosticados, poucos marcadores prognósticos a nível molecular foram caracterizados de forma eficiente e adicionados na rotina clínica e cirúrgica em medicina veterinária, ao contrário do que acontece na oncologia humana. A identificação de fatores prognósticos de confiança é essencial, a fim de estimar o risco individual de uma evolução clínica desfavorável. Na literatura, encontramos um número crescente de investigações em busca de marcadores adequados para o câncer de mama canino, incluindo receptores hormonais, marcadores de proliferação, receptor de fator de crescimento epidérmico humano (HER2), p53, entre outros (MILL et al., 2003; LEE et al., 2004; ART, 2005). Em um trabalho de avaliação imunohistoquímica em 102 casos de neoplasias malignas, os autores encontraram fenótipos moleculares distintos, assim como em humanos. Foi identificado um subtipo de carcinoma *basal-like*, que representou cerca de 30% dos casos, significativamente associado com um comportamento clínico mais agressivo (GAMA; ALVES; SCHMITT, 2008). No entanto, a experiência clínica ainda é muito limitada, e resultados fidedignos em estudos prospectivos nem sempre estão disponíveis.

Como comentado anteriormente, não é só na análise histopatológica que a oncologia comparada se baseia. Estudos moleculares, principalmente ligados à genômica, transcriptômica e proteômica, também têm sido de grande valia na pesquisa básica em câncer de mama entre cães e humanos. Um estudo realizado por Uva e colegas (2009), fez uma análise comparativa da expressão gênica de vias moleculares em tecidos saudáveis e neoplásicos, de caninos e humanos, através da técnica de microarranjo. Os resultados mostram que um número significativo de

genes diferencialmente expressos em neoplasias de glândula mamária em humanos, em comparação com amostras de humanos normais, também foi encontrado desregulado no modelo canino, incluindo as vias PI3K/AKT, RAS, PTEN, WNT- β catenina e também a cascata MAPK (UVA et al., 2009). Em outro estudo com carcinomas caninos, pesquisadores identificaram 21 proteínas expressas de maneira diferente em neoplasias metastáticas e não-metastáticas. A maioria, envolvidas em funções celulares relevantes para a propagação metastática como a adesão celular, a modulação da matriz extracelular e a resistência à hipóxia. Curiosamente, 19 entre as 21 proteínas já haviam sido descritas anteriormente na medicina, sendo a expressão associada à malignidade do câncer de mama e outros tipos de câncer humanos (KLOPFLEISCH et al., 2010).

Mas assim como em roedores, deve-se ter cuidado na interpretação dos dados obtidos em modelos caninos quando da extrapolação para o que acontece no câncer humano. Mesmo com diversos estudos mostrando que o cão pode ser útil para o entendimento de neoplasias humanas, ainda pouco se sabe sobre de que forma os tumores em cães se desenvolvem, e qual o comportamento das vias regulatórias que regem a progressão tumoral na espécie. O entendimento das bases biológicas e moleculares da evolução neoplásica em cães deve ser prioridade antes da aplicação na medicina comparada e translacional.

2.5.2 Células-tronco cancerosas em neoplasias mamárias em cães

Há um grande interesse dos pesquisadores do isolamento e caracterização de CSCs em neoplasias espontâneas de cães e gatos, por razões já comentadas anteriormente. Em cães, são poucos os trabalhos que descrevem informações referentes às CSCs em tumores mamários, e todos até o momento trabalharam com cultivos de células. As linhagens celulares sem dúvidas fornecem um recurso valioso para a investigação das características associadas, mesmo que transitoriamente, à expressão de fenótipos. No entanto, é importante avaliar esses dados com parcimônia, a fim de evitar uma interpretação errônea, inferindo uma característica

de “células-tronco tumorais” onde razões biológicas mais simples poderiam explicar as observações.

O primeiro relato de isolamento de MaSC (*Mammary Stem Cell*, ou Célula-tronco mamária) e CSCs em tumores de glândula mamária em cão foi realizado por Cocola et al., que investigou a propagação de ambos os grupos, mamoesferas e tumoresferas, durante cinco passagens em culturas de baixa aderência. Estas células exibiram propriedades de auto-renovação, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, formaram estruturas tubulares *in vitro* e tumores *in vivo* em camundongos não-obesos e imunocomprometidos NOD/SCID (COCOLA et al., 2009). A partir daí, alguns trabalhos já foram publicados, demonstrando que as características mais eficientes para a separação de populações enriquecidas com células que talvez correspondessem às CSCs, assim como em seres humanos, poderiam estar ligadas principalmente à expressão dos fenótipos CD44, CD24, CD49f, CD133, p21, CK14 (COCOLA et al., 2009; BLACKING; WATERFALL; ARGYLE, 2011; MICHISHITA et al., 2011), e também à maior atividade de enzimas responsáveis pelo metabolismo intracelular. Nesta, os principais métodos de isolamento incluem a atividade intracelular de aldeído-desidrogenase (ALDH), e o método *Side Population* (SP), que consiste na avaliação da célula quanto ao efluxo de Hoechst 33342, ambos através da separação por citometria de fluxo.

Em cães, a alta expressão de aldeído-desidrogenase foi detectada em quatro linhagens de carcinomas mamários caninos, e estas células se mostraram enriquecidas pelo fenótipo CD44⁺/CD24⁻, mais uma vez apresentando a capacidade de auto-renovação e tumorigenicidade em animais imunodeficientes (MICHISHITA et al., 2012), indicando que a atividade de ALDH pode ser um marcador para CSCs em neoplasias mamárias caninas. Já a técnica SP tem sido questionada não só devido à variação nos resultados (SMALLEY; CLARKE, 2005), mas também por talvez afetar a diferenciação celular (ADAMSKI et al., 2007). No entanto, afirma-se que o perfil transcricional de células SP positivas em tumores de mama tem um enriquecimento de expressão em genes da regulação do ciclo celular e pontos de controle, transportadores MDRs, organogênese e vasculogênese (BEHBOD et al., 2006), podendo ser uma análise importante no isolamento e caracterização das populações superiores na cadeia hierárquica dos tumores sólidos.

Finalmente, no que diz respeito à investigação do câncer de mama e do papel das células-tronco mamárias no desenvolvimento de neoplasias, o modelo de tumor espontâneo canino ainda é um recurso subutilizado. No entanto, vários grupos de pesquisa já foram capazes de isolar e caracterizar possíveis CSCs com sucesso nesta espécie, usando protocolos semelhantes àqueles utilizados nos modelos humanos e de roedores, indicando o potencial promissor dessas células na pesquisa básica, bem como pesquisa oncológica translacional.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterização de cultivos de células neoplásicas oriundas de carcinomas mamários de cadelas e avaliação do potencial tumorigênico de populações celulares selecionadas pelos marcadores ALDH, CD44 e CD24.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização e caracterização do cultivo de células neoplásicas de carcinomas mamários de cadelas quanto à morfologia, proliferação celular, citogenética e expressão de marcadores de células epiteliais e mesenquimais;
- Avaliação e quantificação da presença de populações CD24⁻, CD44⁺ e ALDH^{hi} em culturas primárias de células neoplásicas oriundas de carcinomas mamários de cadelas;
- Validação do potencial tumorigênico das populações acima descritas em ensaios in vitro.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL UTILIZADO NO ESTUDO

Todas as amostras de tecidos neoplásicos foram coletadas a partir de mastectomias unilaterais ou bilaterais realizadas no Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP, bem como em clínicas veterinárias particulares localizadas em São Paulo/SP, Pirassununga/SP e região, que concordaram em colaborar com o presente projeto (Quadro 6). Ao todo, foram coletadas amostras de tecido de trinta e cinco (35) cães, todas avaliadas e classificadas pela análise histopatológica. Aquelas que tinham origem em glândula mamária foram categorizadas seguindo a classificação de Goldschmidt (GOLDSCHMIDT et al., 2011).

Quadro 6 - Clínicas parceiras que contribuíram com amostras para o presente estudo

CLÍNICA	MÉDICO VETERINÁRIO	CIDADE
Cia do bicho	Alessandra	Pirassununga/SP
CEPAC é o bicho	Marcus Vazan	Pirassununga/SP
Pet's Stop	Mariney	Pirassununga/SP
-	Juliana Casals	Pirassununga/SP
Clínica Santa Rita	Milena Adami	Leme/SP
Hamvet	Sílvio Ramos e Tânia Ávila	Leme/SP
-	Beatriz Martins	São João da Boa Vista/SP
PetVip	Bruno Monteiro	São João da Boa Vista/SP
Animal Planet	Paulo Côte Neto	Araras/SP
Central	Nilson J. Bianchim	Araras/SP
LinVet	Valmir B. do Nascimento	Araras/SP
-	Mariana V. dos Santos	Osasco/SP
-	João Paulo Boccia	São Paulo/SP

Logo após a excisão cirúrgica de cada amostra, foram removidas todas as áreas de tecido adiposo, e possíveis áreas de necrose. O restante do material foi então dividido em três fragmentos: o primeiro, colocado em formol tamponado a 10% para avaliação histopatológica; o segundo, transportado em solução de RNA-later e posteriormente conservado à temperatura de -80°C; e por fim, do terceiro fragmento foi retirada toda a pele e tecido subcutâneo adjacente, sendo então lavado em PBS a 5% de antibiótico e antimicótico (PenStep, Gibco®) e colocado em meio de transporte estéril, composto por meio de cultivo DMEM-F12 (Life Technologies®) a 5% de antibiótico, à 4°C, até a chegada ao laboratório.

5.2 CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS ORIUNDAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS

O material coletado para o estabelecimento do cultivo primário foi picado manualmente com o uso de tesoura, pinça e lâminas estéreis, em fragmentos de 1 a 2 mm³. Posteriormente, foram dissociados enzimaticamente em rotação constante de 100 rpm por duas horas a 37°C, em meio DMEM-F12 suplementado com 200 U/mL de Colagenase tipo I (Sigma Aldrich®), 100 U/ml de Hialuronidase (Sigma Aldrich®) e 2% de antibiótico, até que houvesse dissociação do tecido tumoral. Depois, adicionou-se 1 mL de tripsina/EDTA, e o tubo foi levado ao shaker por mais uma hora. O material foi passado primeiramente em um *cell Strainer* de 100 µm, e logo depois filtrado em 40 µm a fim de remover grumos de células. O meio foi então centrifugado a 350G durante 5 minutos, o sobrenadante descartado, e o pellet ressuspensionado em PBS previamente aquecido em banho-maria a 37°C. As células foram lavadas em PBS até que o *pellet* se apresentasse limpo, sendo ressuspensionado finalmente em meio de cultivo suplementado.

Após a etapa de dissociação do tecido neoplásico, as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de Trypan, onde 10 µL de meio contendo células foram adicionados a 10µL de azul de Trypan, e contados em câmara de Neubauer. O meio contendo as células dissociadas foi levado ao cultivo celular em garrafas estéreis de 25cm³ a 37°C e saturação de 5% de CO₂, em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 1% de *Mammary Epithelial Growth*

Supplement (MEGS, Gibco®, Life Technologies), 5% de Soro Fetal Bovino e adicionado de 1% de antibiótico/antimicótico.

A evolução foi acompanhada diariamente através de microscopia óptica. Foram adicionados 2 mL de meio de cultivo novo em cada garrafa, a cada 48 horas, para manutenção da cultura. Quando atingiam 70% de confluência, todas as garrafas foram submetidas à atividade de Tripsina/EDTA diluída para 0,25% (Gibco®, Life Technologies), e então subdivididas em novas garrafas estéreis para multiplicação das colônias celulares. Brevemente, após o descarte do meio de cultura adicionou-se 5 mL de PBS à 37°C em cada garrafa, para remoção de debris celulares e demais contaminantes que pudessem estar presentes à cultura. O PBS foi prontamente descartado para a adição de 2 mL de solução Tripsina/EDTA 0,25%. O material permaneceu em estufa à 37°C até que todas as células fossem soltas das garrafas, e formassem uma suspensão celular. Para inativação da enzima, usou-se 10 mL de meio de cultivo a 10% de Soro Fetal Bovino. A suspensão foi centrifugada a 1200 rpm por cinco minutos, o sobrenadante descartado, e o *pellet* ressuspendido em DMEM-F12 completo. O volume foi dividido igualmente, e completado para 10 mL por garrafa de 75cm³.

4.3 TEMPO DE DUPLICAÇÃO CELULAR

Para avaliação da velocidade de duplicação celular de cada amostra, foram cultivadas 5×10^4 células por poço, em placa de 6 poços, com meio de cultivo suplementado conforme descrito anteriormente. O número de células foi contado em câmara de Neubauer em intervalos de 24 horas, por um período total de 120 horas. Todas as amostras foram contadas no mesmo horário, e da mesma forma durante todo o experimento. Os resultados foram avaliados através do programa *Doubling-Time* (disponível em (14/01/2015): <http://doubling-time.com/compute.php>). O tempo de duplicação foi realizado em dois momentos: o primeiro, antes da 10ª passagem, e o segundo, quando todos os cultivos ultrapassaram a 20ª passagem.

5.4. AVALIAÇÃO CITOGENÉTICA POR CARIOTIPAGEM

A contagem do número de cromossomos foi realizada pelo método de coloração de Giemsa. Brevemente, as células foram cultivadas em placas de Petri durante o tempo necessário para alcançarem a fase M do ciclo celular, com base nos resultados obtidos pelo tempo de duplicação. Decorrido o tempo da cultura celular, adicionou-se 50 µL de solução de Colchicina (16mg/mL) para suspensão do ciclo celular em metáfase, e a placa incubada em estufa a 37°C durante 3 horas. O meio de cultivo então foi coletado em um tubo Falcon de 15mL, e as células aderidas passaram pelo processo de tripsinização para retirada do material de cultivo, sendo colocadas juntamente com o meio armazenado na etapa anterior. O tubo foi centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante descartado cuidadosamente com uma pipeta, e o *pellet* ressuspensionado em 5 mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi incubado por 30 minutos a 37°C, sendo homogeneizado suavemente com uma pipeta em intervalos de 5 minutos. Logo depois, adicionou-se 2 mL de fixador gelado (metanol/ácido acético 3:1) e a solução homogeneizada novamente durante 1 minuto. O tubo foi levado a centrifugação em 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado cuidadosamente com uma pipeta, e o *pellet* ressuspensionado em 0,5-1 mL de fixador gelado, acertando a diluição dependendo do volume de células.

As lâminas foram lavadas e secas com papel macio para receber a preparação, e permaneceram durante 24 horas imersas em etanol 70%, a -20°C. Para a confecção das lâminas, foram retiradas do etanol e secas novamente com papel limpo e macio. Então, duas a quatro gotas da suspensão de células foram dispensadas da pipeta a uma altura superior a 30 cm, para possibilitar o rompimento das células e permitir o espalhamento dos cromossomos. As lâminas foram secas ao ar, e então coradas com solução de Giemsa durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Depois deste processo, foram lavadas com água destilada, secas ao ar, e montadas com lamínulas limpas e secas. Os cromossomos foram fotografados em microscópio óptico, em imersão, no aumento de 1000x. Foram contadas vinte metáfases por amostra.

5.5. IMUNOCITOQUÍMICA

As quatro amostras selecionadas para caracterização do cultivo primário foram submetidas à técnica imunocitoquímica para avaliação da expressão dos filamentos intermediários de citoesqueleto: citoqueratina, vimentina e α -actina de músculo liso (detalhes descritos no quadro 7). Cerca de 10^5 células foram cultivadas em lamínulas esterilizadas, em placas de 6 poços, até atingirem confluência suficiente para a realização do experimento. Os poços foram lavados por três vezes, com PBS, para então serem fixados através da adição de 2 mL de metanol absoluto em cada poço, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. As células foram lavadas por mais duas vezes e armazenadas em PBS a 4°C até o momento do teste.

Quadro 7 - Anticorpos utilizados para avaliação imunocitoquímica

Anticorpo	Diluição	Incubação	Clone	Marca
Anti-citoqueratina	1:100	1 h	A1/A3	Dako, Carpinteria, CA
Anti-vimentina	1:100	1 h	V9	Dako, Carpinteria, CA
Anti- α -sma	1:100	1 h	HHF35	Dako, Carpinteria, CA

Para a marcação imunocitoquímica, as lamínulas foram lavadas previamente por duas vezes de cinco minutos com PBS/Triton x100, para uma melhor distribuição dos reagentes. Então, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, através da incubação com solução de peróxido de hidrogênio a 20% diluída em metanol absoluto durante uma hora. As lamínulas foram lavadas com PBS/Triton por mais três vezes de cinco minutos, e adicionadas de solução de leite em pó desnatado a 5%, e incubadas em estufa aquecida a 60°C, durante uma hora, para bloqueio de possíveis marcações inespecíficas. O anticorpo primário foi diluído em PBS/Triton adicionado de BSA a 0,1% para todas as marcações realizadas, sendo preparados 50 μ L de solução para cada lamínula cultivada. As células foram incubadas com o anticorpo primário durante 1 hora em temperatura ambiente e então lavadas por

mais três vezes com PBS/Triton. Depois, utilizou-se o kit LSAB+ System-HRP (Dako, Carpinteria, CA), sendo que o anticorpo secundário foi incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente, e a Streptavidina incubada por mais 20 minutos, também em temperatura ambiente.

A marcação foi visualizada através da revelação por DAB, as lamínulas posteriormente contracoradas com hematoxilina e montadas em lâminas para serem observadas e fotografadas em microscópio óptico.

5.6 SEPARAÇÃO DE POPULAÇÕES CELULARES POR BEADS MAGNÉTICAS ATRAVÉS DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CD24/CD44

Depois de estabilizado o cultivo celular em monocamada, ou seja, com todas as colônias de células em condições de aderência e em proliferação, as amostras oriundas da dissociação tumoral da glândula mamária foram submetidas à tripsinização semelhante ao procedimento adotado para o repique convencional. Após a centrifugação realizada posterior à inativação enzimática da Tripsina, a suspensão celular foi avaliada quanto à viabilidade, e o número de células ajustado para uma concentração aproximada de 2×10^6 células. O método escolhido para separação das populações positivas e negativas quanto à expressão destas proteínas foi a marcação com anticorpos biotinilados específicos para CD24 e CD44, conjugação com as *beads* magnéticas (CELLection Kit, Life Technologies®) e posterior isolamento da população positiva através do auxílio de atração magnética promovida por um ímã, conforme protocolo descrito a seguir.

Antes da realização do procedimento, se fez necessário a lavagem e purificação das *beads* magnéticas antes de serem conjugadas com o anticorpo desejado. Sendo assim, 25 µL da solução de *beads* foram adicionados a 1 mL de PBS a 0,1% de Soro Fetal Bovino (consistindo do Buffer 1, CELLection Kit), e o tubo colocado no ímã durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, e as *beads* então estariam prontas para a realização das técnicas de separação. Tanto a técnica de forma direta quanto a de forma indireta foram testadas para marcação de CD44:

- Técnica direta: em tubo estéril, 1 µg de anticorpo específico para CD44 (BD Pharmingen™, biotin rat anti-mouse CD44) e CD24 (BD Pharmingen™, biotin rat anti-mouse CD24) foi conjugado às *beads* magnéticas em temperatura ambiente durante 30 minutos. Após este período, o tubo foi colocado no imã por 1 minuto, o sobrenadante descartado, e este procedimento repetido por mais três vezes para remoção de anticorpos que porventura não foram conjugados. Então, as *beads* ligadas ao respectivo anticorpo foram adicionadas à amostra de células em suspensão, na concentração desejada. O material foi incubado em temperatura de 4°C por 20 minutos, quando então foi recolocado no imã para separação da população positiva, que no caso, ficariam aderidas na parede do tubo por força da atração magnética promovida pelo imã. O conjunto *beads*/anticorpo/células foi ressuspensionado em Buffer 1 e recolocado no imã por mais duas vezes, sendo que o sobrenadante de todas as lavagens foi retirado e colocado em tubo estéril para verificação de células não-marcadas. Para interrupção da ligação entre as *beads* magnéticas e as células, utilizou-se 4 µL de Release Buffer (solução de DNase I) por um período de 15 minutos em incubação e agitação leve à temperatura ambiente. Após a liberação das células das *beads* magnéticas, a população marcada para CD44 foi avaliada pelo método de exclusão de azul de Trypan e posteriormente levada ao cultivo celular.

5.7 SEPARAÇÃO DE POPULAÇÕES POSITIVAS PARA A ATIVIDADE DE ALDEÍDO-DESIDROGENASE (ALDH) ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

A atividade celular de aldeído-desidrogenase (ALDH) foi analisada com o auxílio do kit Aldefluor® (StemCell Technologies, EUA) conforme instruções do fabricante. Foram preparados dois tubos para cada amostra, sendo um tubo teste e um tubo controle. Brevemente, 10⁶ células/mL foram ressuspensionadas em 1,5 mL de tampão e dispensadas em um tubo estéril, para então serem adicionadas de 5 µL/mL de reagente ativado Aldefluor®. Rapidamente, 500 µL desta suspensão foram transferidas a outro tubo (controle da reação) contendo 5 µL de DEAB (inibidor da reação entre a enzima e o reagente). As amostras foram incubadas por 40 minutos a

37°C, e então centrifugadas a 4°C a uma velocidade de 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 0,5 mL do tampão específico do kit. Os tubos foram mantidos no gelo até a análise. Para exclusão de células mortas utilizou-se Hoechst (Hoechst 33342, Life Technologies®, USA) cinco minutos antes da análise.

5.8 CULTIVO CELULAR PARA FORMAÇÃO DE TUMORESFERAS

A capacidade de formação de colônias em condições de baixa aderência das células avaliadas quanto ao fenótipo CD24, CD44 e atividade de ALDH foi realizada através da cultura em condições de baixa aderência, com meio de cultivo livre de soro fetal bovino suplementado para permitir a multiplicação celular, método este já bem definido quanto à caracterização de Células Iniciadoras de Tumor e o potencial de auto-renovação e formação de esferas que apresentam.

Para tal, o número de células em cada população foi ajustado para uma concentração aproximada de 750 células/mL, no volume de 0,5 mL/poço a fim de evitar a adesão das células e possível diferenciação celular. As amostras foram plaqueadas em placas de baixa aderência (24-well low-adherent plates, Corning®, USA) em meio DMEM-F12 suplementado com 20 ng/mL de EGF (PrepoTech, USA), 10 ng/mL de FGF (PrepoTech, USA), 5 µL/mL de insulina bovina (Sigma Aldrich®, MO, USA) e 1% de antibiótico/antimicótico (PenStep, Gibco, Life Technologies®, USA). Para manutenção do cultivo celular, 50 µL/poço de meio fresco foi adicionado a cada 48 horas, e diariamente a placa era avaliada através de microscopia óptica. A cultura foi analisada por 14 dias consecutivos.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada para avaliação de significância na validação do ensaio de tumorigênese *in vitro* para os grupos ALDH^{low} e ALDH^{hi}, foi a análise de variância (ANOVA) em uma via para verificação das diferenças amostrais entre os fenótipos, seguida do *pos-hoc* Bonferroni. Para análise estatística quanto ao número de esferas formadas a partir da separação dos fenótipos CD24 e CD44, foi adotado o teste t de Student. As análises foram geradas pelo programa GraphPad Prism® 5.0, San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS CLÍNICOS

Ao todo, trinta e cinco animais contribuíram neste trabalho. Todas as lesões foram coletadas por excisão cirúrgica através de mastectomia eletiva, e todas foram submetidas à avaliação anatomopatológica para definição do tecido de origem. Vinte e nove animais (82,9%) foram considerados no presente estudo, pois apresentavam lesão neoplásica em glândula mamária; outros dois (5,7%) foram diagnosticados com cistos de queratina ou lesões papilomatosas, e em quatro (11,4%), o material era insuficiente para estabelecer o diagnóstico, devido à qualidade e integridade do tecido fixado (Gráfico 4). Portanto, estes seis animais foram excluídos das demais análises.

Gráfico 4 - Distribuição dos casos nos trinta e cinco cães coletados no estudo, baseado no tecido de origem e número de lesões por animal

Legenda: à esquerda, distribuição dos casos segundo origem da lesão, nos trinta e cinco animais submetidos à mastectomia eletiva. À direita, número de lesões distribuídas nos vinte e nove animais com alteração em glândula mamária

A maioria dos casos (19/29) apresentava múltiplas lesões, enquanto que dez casos tinham um único nódulo (34,5%) (Gráfico 4). Quanto à idade dos animais no momento da cirurgia, onze (37,9%) tinham de 6 a 10 anos de idade, doze (41,4%)

apresentavam-se entre 11 a 15 anos de idade, três (10,3%) tinham mais de 16 anos e em três casos (10,3%), o proprietário ou veterinário não sabiam informar a idade do paciente (Gráfico 5). Das vinte e nove fêmeas diagnosticadas com neoplasia mamária, um animal era da raça Daschund (3,4%), um Collie (3,4%), um Yorkshire Terrier (3,4%), um American Pitbull Terrier (3,4%), um Cocker Spaniel Inglês (3,4%), dois Beagles (6,9%), três Pinscher miniatura (10,3%) e sete Poodles (24,1%), sendo que os dois Beagles apresentavam grau de parentesco: mãe e filha. Porém, a maior parcela foi representada pelos animais sem raça definida, em número de doze, somando 41,4% do total (Gráfico 5). Em alguns casos, as múltiplas nodulações exibiam apresentações histopatológicas distintas. A distribuição das trinta e cinco lesões de acordo com a classificação histopatológica está descrita na tabela 1.

Gráfico 5 - Distribuição dos casos quanto à idade (anos) e raça

Tabela 1 – Distribuição das lesões segundo classificação histopatológica

(Continua)

	Nº de lesões	%
Carcinoma Complexo	8	22,9
Carcinoma Misto	5	14,3
Carcinoma Sólido	4	11,4
Tumor Misto Benigno	3	8,6
Comedocarcinoma	2	5,7
Hiperplasia Lobular	2	5,7
Carcinoma de Células Escamosas	2	5,7
Neoplasia de Células Fusiformes	1	2,9
Carcinoma Tubulopapilífero	1	2,9
Carcinoma Anaplásico	1	2,9

		(Conclusão)
Carcinoma adenoescamoso	1	2,9
Fibrossarcoma	1	2,9
Adenoma Basalóide	1	2,9
Carcinoma Tubular	1	2,9
Adenoma Tubular Simples	1	2,9
Carcinoma Ductal	1	2,9
Total	35	100%

Apenas uma das vinte e nove fêmeas era castrada antes do desenvolvimento tumoral, porém, foi castrada aos nove anos de idade por conta de piometra. Nenhum animal recebeu tratamento hormonal exógeno para controle do ciclo estral, ou apresentou outro tipo de neoplasia anterior ao tumor mamário. Com exceção da Beagle citada anteriormente, cuja mãe também apresentava câncer em glândula mamária, não eram conhecidos os ascendentes das demais fêmeas. Não houve informações suficientes sobre número de acasalamentos, número de gestações ou abortos para a compilação dos dados, provavelmente dado ao desconhecimento pelo proprietário ou clínico veterinário.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DOS CULTIVOS CELULARES

6.2.1. Dissociação e cultivo primário em monocamada

Das trinta e cinco amostras de glândula mamária, vinte e seis foram encaminhadas para o cultivo primário, de acordo com o descrito em material e métodos. Foi definido um protocolo padrão para a dissociação e para o cultivo primário das células obtidas a partir da excisão cirúrgica de neoplasias da glândula mamária em cães. Após a dissociação e incubação, dezesseis apresentaram quantidade considerável de células grandes, bem delimitadas, que em cerca de uma semana já estavam completamente aderidas, formando grandes populações

celulares ao longo de toda a extensão da garrafa. Em todas as garrafas cultivadas, as amostras apresentaram células bem conservadas e vivas, visualizadas através de diluição em Azul de Trypan. Também, notou-se a presença de dois grupos distintos de células aderidos à garrafa, que variavam em morfologia. O primeiro, com características morfológicas de células mesenquimais, em formato fusiforme, núcleo e nucléolos bem definidos. Algumas se apresentaram binucleadas ou multinucleadas; já o segundo grupo, apresentava morfologia de células ovaladas ou triangulares, com citoplasma extenso, muitas apresentando dois ou mais núcleos (também bem definidos), dispostas em monocamada pavimentosa de formato poligonal (Figura 8). Este protocolo permitiu o sucesso no cultivo de dezesseis das vinte e seis amostras colocadas em cultivo, possibilitando a escolha de quatro culturas para a caracterização quanto à origem tumoral das células que proliferaram *in vitro* (Tabela 2).

Figura 8 - Células provenientes da dissociação de neoplasias mamárias de cadelas, em condições de aderência

Legenda: células com aproximadamente dez dias de cultivo sob condições controladas, antes da primeira passagem. Observam-se populações distintas tanto no aspecto morfológico individual quanto na disposição das colônias quando em confluência. Aumento de 200x.

Tabela 2 - Culturas primárias de neoplasias de glândula mamária em cães, selecionadas para caracterização celular

	ANIMAL	RAÇA	IDADE	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
005/13	Branca	SRD	13 anos	Comedocarcinoma
020/14	Cacau	Daschund	9 anos	Carcinoma Misto
025/14	Lessie	Collie	13 anos	Carcinoma Misto
028/14	Laica	Beagle	13 anos	Carcinoma Misto

As quatro amostras foram selecionadas para caracterização quanto a: morfologia celular do cultivo em monocamada; expressão imunocitoquímica de citoqueratina, vimentina e alfa-actina muscular; avaliação citogenética por cariotipagem; avaliação do tempo de duplicação celular; quantificação das populações positivas e negativas quanto ao fenótipo CD24/CD44; e avaliação das populações quanto à expressão de aldeído-desidrogenase.

6.2.2. Classificação histopatológica e morfologia da cultura primária

O material fixado em formol foi processado para obtenção de lâminas histológicas, e estas coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação e classificação histopatológica das lesões que foram encaminhadas ao cultivo de células. Do mesmo modo, as culturas primárias foram cultivadas em lamínulas, fixadas e coradas em HE para caracterização quanto à morfologia celular.

Amostra 005/13: Macroscopicamente, anterior à mastectomia, a lesão se apresentava de forma inflamatória, parcialmente ulcerada, com eritema, perda de pelos e pústulas na região abdominal. A formação neoplásica era extensa no comprimento longitudinal, chegando a 10 cm de extensão. Histologicamente, foi diagnosticada como comedocarcinoma, com a lâmina histológica caracterizada pela presença de áreas necróticas em meio a agregados celulares neoplásicos em consequência de células apoptóticas e cariorréxis subsequente. Nas áreas de necrose, presença de grande quantidade de material eosinofílico, amorfo, entremeado com debris celulares, neutrófilos e alguns macrófagos. O tecido adjacente aos focos de necrose consiste em agregados celulares organizados de maneira sólida, tubulares e em cordões, apoiados por estroma fibrovascular (Figura 9). Na cultura primária, as células aderidas em monocamada se apresentaram em formato alongado, com tamanho variado apesar de ter em sua maioria células pequenas, e algumas células binucleadas. Em relação ao núcleo, formato oval, presença de anisocariose, nucléolos evidentes e múltiplos em muitas células, alguns em formato angular. Quando em grande confluência, as células tendem a formar redes, deixando áreas livres entre os grupos celulares. No início, era comum o

crescimento de agregados de células em formato esferoide, característica que diminuiu com o aumento das passagens (Figura 10). Não houve alteração perceptível de morfologia celular em nenhum momento da cultura.

Figura 9 - Lâmina histológica da amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: presença de áreas necróticas em meio a agregados celulares neoplásicos. O tecido adjacente aos focos de necrose mostra agregados celulares organizados de maneira sólida, tubulares e em cordões, apoiados por estroma fibrovascular. Aumento 40x.

Figura 10 - Morfologia do cultivo celular, amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: (A) organização do crescimento celular quando em confluência superior a 60%. Hematoxilina/eosina. Aumento 100x. (B) morfologia das células aderidas em cultivo, exibindo anisocariose, nucléolos únicos ou múltiplos, às vezes angulares. Hematoxilina/eosina. Aumento 400x. (C, D) crescimento celular em formato esferoide, em garrafas de cultura (C) e lamínula (D). Hematoxilina/eosina (D). Aumento 200x (C) e 400x (D).

Amostra 020/14: Antes da ressecção, a neoplasia se apresentava de maneira sólida, medindo cerca de 9 cm de diâmetro, bastante calcificada no interior do nódulo. Histologicamente, a amostra era composta por massa neoplásica mista, apresentando componente epitelial de arranjo tubular predominante, com uma a três camadas de células em seu revestimento, cúbicas, mostrando núcleos com discreta a moderada anisocariose, nucléolo único e evidente, mas sem hiper cromasia e as figuras de mitose são raras. Apesar disso, havia focos onde as células ultrapassam os limites glandulares, invadindo o estroma adjacente. Inseridas da matriz mixoide, encontram-se células alongadas, com núcleos ovais ou alongados, sendo esta

abundante em algumas regiões. Também foram visualizados focos de tecido cartilaginoso, caracterizando um carcinoma misto (Figura 11). No cultivo, desde a primeira passagem as células apresentavam morfologia epitelial, formando um tapete de células cuboides, muitas delas multinucleadas, com nucléolos evidentes e cromatina pontilhada. Entremeadas, encontram-se células grandes, com citoplasma amplo, apresentando cinco ou mais núcleos e/ou núcleos aberrantes, nucléolos bem definidos, múltiplos e por vezes angulares. Algumas células apresentam vacúolos numerosos. A morfologia da amostra 020/14 apresentou pouca variação durante o tempo de cultivo, estabilizando após a 20ª passagem (Figura 12).

Figura 11 - Lâmina histológica da amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: tecido de arranjo tubular predominante, com uma a três camadas de células em seu revestimento, em meio ao estroma composto por células alongadas e matriz mixoide. Aumento 40x;

Figura 12 – Morfologia do cultivo primário, amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: células apresentando morfologia epitelial, exibindo células grandes, com citoplasma amplo, apresentando cinco ou mais núcleos e/ou núcleos aberrantes, nucléolos bem definidos, múltiplos e por vezes angulares. (A) distribuição em monocamada. Aumento 40x. (B, C, D) Células gigantes, com um ou mais núcleos. Aumento 100x (B). Aumento 400x (C); Aumento 1000x (D).

Amostra 025/14: o animal foi encaminhado à mastectomia apresentando vários nódulos em região mamária, todos de consistência firme, variando entre 0,5 a 3 cm de diâmetro. Dos oito nódulos encaminhados para histologia, cinco apresentavam características histopatológicas distintas, sendo duas malignas e três benignas. O maior nódulo foi levado ao cultivo de células, e tratava-se de um carcinoma misto. A lâmina histológica exibiu amostra composta por massa neoplásica mista, sendo o componente epitelial o tipo predominante com múltiplas camadas de células em seu revestimento. Há focos onde as células ultrapassam os limites glandulares, invadindo o estroma adjacente. Entremeadas, encontram-se

células alongadas, com núcleos ovais ou alongados, em meio a matriz mixoide. Também são visualizados focos de tecido cartilaginoso (Figura 13). Em cultivo, a amostra 025/14 apresentou células alongadas, crescendo de maneira desorganizada e tendendo a formar redes e grupos densos de células quando em alta confluência, indicando perda de inibição por contato. Comum a presença de células bi e multinucleadas, com núcleos redondos ou ovais e cromatina pontilhada. A morfologia também se manteve durante todo o cultivo, mesmo após a 35ª passagem (Figura 14).

Figura 13 - Lâmina histológica da amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: carcinoma misto, exibindo amostra composta por massa neoplásica mista, sendo o componente epitelial o tipo predominante. Aumento 40x.

Figura 14 - Morfologia do cultivo celular, amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: (A, B) organização do crescimento celular quando em confluência superior a 60%. Hematoxilina/eosina. Aumento 100x. (C) Presença de célula binucleada, nucléolo único, evidente e com formato angular. Hematoxilina/eosina. Aumento 400x (D) Célula multinucleada, mitose irregular com consequente deformação nuclear. Hematoxilina/eosina. Aumento 400x.

Amostra 028/14: macroscopicamente, a lesão era de consistência firme, com cerca de 5 cm de diâmetro. Diagnosticado como carcinoma misto, histologicamente composto por amostra de tecido mamário contendo proliferação mista de células epiteliais cúbicas distribuídas em túbulos e população de células fusiformes em meio a matriz mixóide. Também estão presentes focos de tecido cartilaginoso. As células epiteliais se distribuem predominantemente em túbulos, mas perdem esta definição em pelo menos um terço do corte histológico, em que são encontradas de forma isolada ou em cordões em meio ao estroma. Há moderada anisocariose, os núcleos

contém cromatina pontilhada e com nucléolo evidente na maioria das células. Há figuras de mitose típicas em pequeno número (Figura 15). Na cultura primária, a amostra 028/14 foi a que mais apresentou mudança no fenótipo com o aumento das passagens. Inicialmente, a monocamada era composta por células de formato mais alongado, com citoplasma amplo, um ou dois núcleos com nucléolo evidente, geralmente único, redondo ou angular. Entre a 15ª e 16ª passagens, o cultivo *in vitro* apresentou ilhas de células epiteliais pequenas e cúbicas cercadas por células de aspecto mesenquimal simulando estroma tecidual, formando populações bem definidas nas garrafas de cultura. Porém, devido a proliferação mais rápida das células com morfologia epitelial, nas passagens seguintes elas acabaram por dominar o cultivo primário, e a cultura estabilizou a partir da 18ª passagem. As células se apresentam com relação núcleo/citoplasma diminuída, muitas células multinucleadas, grande vacuolização do citoplasma, e perda evidente da inibição do crescimento por contato, sendo possível a visualização de células sobrepostas. Os núcleos são grandes, com nucléolos aumentados, múltiplos, muitas vezes angulares, cromatina densa e irregular. Mitoses aberrantes também são comuns (Figura 16).

Figura 15 - Lâmina histológica, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: tecido neoplásico apresentando foco de tecido cartilaginoso, formações tubulares e cordões de células epiteliais em meio à matriz mixoide e células estromais. Formações tubulares com perda de definição pela proliferação exacerbada. Aumento 40x.

Figura 16 - Morfologia do cultivo celular, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: (A) organização do crescimento celular quando em confluência superior a 90%. Nota-se agregados celulares, de células que perderam inibição por contato e cresceram em camadas. Hematoxilina/eosina. Aumento 100x. (B) Células multinucleadas, nucléolos grandes e desuniformes, células em divisão; perda da relação núcleo/citoplasma. Hematoxilina/eosina. Aumento 400x (C) Célula em mitose, cromatina desorganizada. Hematoxilina/eosina. Aumento 1000x (D) Células multinucleadas, mitose irregular com consequente deformação nuclear. Hematoxilina/eosina. Aumento 1000x.

6.2.3 Tempo de duplicação celular

As culturas foram avaliadas quanto à velocidade de proliferação celular em dois momentos, respeitando um intervalo de no mínimo dez passagens entre os testes. No geral, todas exibiram um tempo de duplicação superior a 20 e inferior a 48 horas. As amostras 020/14 e 028/14 não diferiram de maneira notável entre as avaliações, exibindo uma variação de aproximadamente 2,5 horas, enquanto que, na amostra 025/14, houve um aumento considerável de cerca de 15 horas no tempo de

duplicação, levando a um ciclo celular de 43,8 horas. Ao contrário, na amostra 005/13 houve uma diminuição no tempo de duplicação, ou seja, as células apresentaram um ciclo celular mais curto e maior velocidade de proliferação (Tabela 3).

Tabela 3 - Tempo de duplicação celular das quatro amostras cultivadas.

Amostra	Passagem	Tempo (h)	Variação (h)
005/13	8	32,76	- 6,72
	18	26,04	
020/14	18	25,35	- 2,7
	38	22,65	
025/14	23	28,39	+ 15,41
	33	43,8	
028/14	8	24,75	- 2,82
	20	21,93	

Legenda: as contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, em intervalos regulares de 24 horas, em um total de 120 horas.

6.2.4. Cariotipagem

A avaliação do número de cromossomos de cada cultivo foi realizado em apenas um momento da cultura primária, correspondendo às passagens de número 10, 35, 10 e 26 para as amostras 005/13, 020/14, 025/14 e 028/14, respectivamente. A análise citogenética revelou aneuploidia em cerca de 50% das células cancerosas de cada animal utilizado no estudo. Os resultados demonstraram uma variação ampla no número de cromossomos em um mesmo grupo de células, quando comparado ao número encontrado em células normais ($2n = 78$) (Gráfico 6). A amostra 005/13 foi a que menos variou em relação ao normal, sendo que 30% das

metáfases apresentaram alteração numérica, e assim como a 025/14, a maioria das células demonstrou o valor diploide habitual para a espécie canina (Figura 17). Já na amostra 020/14, não foi possível a visualização de células apresentando $2n=78$. Das vinte metáfases avaliadas, 90% delas apresentaram ganho cromossômico, e a maioria (45%) exibiu um número de 90 cromossomos. A amostra 028/14 foi a que apresentou a maior discrepância em relação à quantidade normal de cromossomos, apesar da baixa variação da ploidia entre as células, sendo que 80% das metáfases exibiram um valor de 56 ou 58 cromossomos.

Gráfico 6 - Análise do número de cromossomos em vinte metáfases por cultura celular

Legenda: distribuição do número de cromossomos avaliados em vinte metáfases por amostra. Estão representadas todas as metáfases, comparadas com o número diploide $2n=78$ para a espécie canina. Nota-se que todas as amostras apresentaram variação no número de cromossomos, com células hipodiploides e hiperdiploides.

Apesar da técnica de coloração utilizada não possibilitar a análise de alterações estruturais, alguns achados citogenéticos puderam ser visualizados. Por exemplo, uma célula presente na amostra 025/14 que, além da aneuploidia pelos 74 cromossomos, apresentou monossomia do cromossomo X (Figura 19). Também, observou-se mitoses aberrantes características de células neoplásicas, principalmente de células malignas. Na amostra 005/13, pudemos verificar a

presença de uma metáfase com mais de 150 cromossomos em uma mesma célula, apesar de não ter sido possível a contagem exata do número devido à sobreposição de cromossomos (Figura 18). Outro achado interessante foi quanto à estrutura dos cromossomos na amostra 028/14. A espécie canina possui 76 cromossomos autossômicos acrocêntricos, mais o par sexual, que são os únicos cromossomos submetacêntrico em cães. Porém, as células da amostra 028/14 apresentaram vários pares de cromossomos submetacêntricos na análise das metáfases, provavelmente dado a modificações estruturais, como por exemplo, as fusões cêntricas (Figura 21 e 22).

Figura 17 - Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula apresentando metáfase com contagem de 76 cromossomos autossômicos mais o par sexual (setas), totalizando $2n=78$. Observa-se a estrutura acrocêntrica dos autossômicos, e submetacêntrica dos sexuais. Aumento 1000x

Figura 18 - Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula apresentando mitose aberrante com número superior a 150 cromossomos. Não foi possível a contagem total devido a sobreposição dos cromossomos. Aumento 1000x.

Figura 19 – Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula neoplásica com metáfase de 73 cromossomos, apresentando monossomia do cromossomo X (seta). Aumento 1000x.

Figura 20 – Avaliação do número de cromossomos por coloração convencional, amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula de neoplasia mamária com apresentação hipodiplóide, com um total de 66 cromossomos. Aumento 1000x.

Figura 21 - Avaliação dos cromossomos por coloração convencional, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula neoplásica apresentando metáfase com 56 cromossomos, sendo grande parte de cromossomos submetacêntricos. Não foi possível a identificação dos cromossomos sexuais. Aumento 1000x

Figura 22 - Avaliação dos cromossomos por coloração convencional, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: célula apresentando metáfase com cromossomos metacêntricos. Nota-se o alongamento dos braços de alguns cromossomos. Não foi possível a contagem do número total. Aumento 1000x.

Esta variação é coerente com a instabilidade genômica característica de células neoplásicas, e os dados obtidos corroboram com a literatura, onde já foram descritos diversos casos de alteração numérica e estrutural em cromossomos de células tumorais em cães. A coloração utilizada na análise das amostras não permitiu a visualização de alterações estruturais adicionais.

6.2.5. *Imunocitoquímica*

Uma das principais formas de caracterização de células em cultivo primário é a avaliação quanto à expressão de marcadores próprios de filamentos intermediários (FI), que podem sugerir a origem tecidual, ou a morfologia que estas células adquiriram quando colocadas em crescimento *in vitro*. As marcações comumente utilizadas nestes casos são feitas pela expressão de: citoqueratina, filamentos característicos de células de origem epitelial; vimentina, expressa por células de origem mesenquimal; e α -actina de músculo liso, marcador de células mioepiteliais.

Neste trabalho, foi realizada a marcação imunocitoquímica para avaliação da expressão dos três interfilamentos estruturais nas quatro amostras selecionadas para a caracterização, bem como em fibroblastos embrionários utilizados como controle negativo quando da marcação de citoqueratina, e controle positivo quando da marcação de vimentina. Os resultados mostraram a expressão de citoqueratina em todas as amostras avaliadas, sendo este FI expresso de forma heterogênea nas amostras 005/13 e 025/14, e de maneira homogênea nas células do cultivo 020/14 e 028/14, sempre apresentando uma marcação intensa nas células positivas. Quanto a vimentina, foi expressa de maneira intensa em todas as células das amostras 005/13 e 025/14, e sem mudanças no perfil de marcação entre as diferentes passagens analisadas (Figuras 23 a 26). Já para as amostras 020/14 e 028/14, que exibiam morfologia celular mais característica de células epiteliais ao final do experimento, a expressão de vimentina ocorreu de forma heterogênea para as células do cultivo 028/14, e negativa para a amostra 020/14; curiosamente, o padrão de marcação destas amostras variou com o aumento das passagens; nos dois casos, a expressão de vimentina era positiva e de maneira homogênea em passagens mais baixas (Figuras 27 e 28). Assim que o cultivo modificou levemente o fenótipo e assumiu a morfologia cúbica característica de camadas epiteliais, houve uma diminuição na expressão deste interfilamento, até chegar ao ponto de não ser expressa, no caso da amostra 020/14. Por último, o α -actina de músculo liso foi expressa de forma heterogênea nas amostras 005/13 e 025/14, semelhante à citoqueratina; no cultivo 028/14, apenas algumas células isoladas expressaram este FI, e de maneira discreta; já para a amostra 020/14, não houve marcação em nenhuma célula avaliada (Figuras 23 a 26).

Figura 23 - Marcação imunocitoquímica, amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: avaliação da expressão de filamentos intermediários, em aumento de 100x (coluna esquerda) e 400x (coluna direita). Nota-se uma expressão heterogênea para a expressão de alfa actina muscular (A, B) e citoqueratina (C, D), e expressão homogênea para a expressão de vimentina (E, F)

Figura 24 - Marcação imunocitoquímica, amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: avaliação da expressão de filamentos intermediários, em aumento de 100x (coluna esquerda) e 400x (coluna direita). Nota-se a expressão negativa para a marcação de alfa actina muscular (A, B) e positiva de forma homogênea para citoqueratina (C, D). Marcação leve e pontual para a expressão de vimentina (E, F)

Figura 25 - Marcação imunocitoquímica, amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: avaliação da expressão de filamentos intermediários, em aumento de 100x (coluna esquerda) e 400x (coluna direita). Nota-se a expressão heterogênea para a marcação de alfa actina muscular (A, B) e citoqueratina (C, D). Marcação homogênea quanto à expressão de vimentina (E, F)

Figura 26 - Marcação imunocitoquímica, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: avaliação da expressão de filamentos intermediários, em aumento de 100x (coluna esquerda) e 400x (coluna direita). Nota-se a pouca expressão para a marcação de alfa actina muscular, sendo expressa somente em algumas células (A, B) e expressão positiva e homogênea para citoqueratina (C, D). Marcação heterogênea também quanto à expressão de vimentina (E, F)

Figura 27 - Marcação imunocitoquímica para expressão de vimentina em diferentes passagens, amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: expressão de vimentina na passagem 14 (A) e passagem 34 (B). Nota-se uma diminuição significativa deste interfilamento com o aumento do tempo de cultivo celular. Aumento 200x (A) e 400x (B)

Figura 28 - Marcação imunocitoquímica para expressão de vimentina em diferentes passagens, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: expressão de vimentina na passagem 8 (A) e passagem 18 (B). Nota-se uma diminuição significativa deste interfilamento com o aumento do tempo de cultivo celular, e uma modificação no aspecto morfológico, antes com características mais alongadas, e depois, assumindo morfologia epitelióide. Aumento 200x (A) e 400x (B)

Nossos dados não permitem a confirmação da origem luminal ou basal das células obtidas no cultivo primário, uma vez que o clone utilizado para a marcação de citoqueratina reage tanto para aquelas expressas na camada basal quanto luminal (CK 5 e 14; e CK 7, 8, 18 e 19, respectivamente). Apenas a expressão associada de α -sma auxilia na sugestão de que estas células teriam uma origem basal. Também não foi possível a avaliação da coexpressão de dois ou mais marcadores em uma mesma célula, uma vez que a técnica utilizada não permite a dupla marcação. No entanto, pela morfologia de cada cultivo, pressupõe-se que não se trata de populações distintas em uma mesma cultura, e sim, de uma heterogeneidade quanto à expressão dos interfilamentos estudados em um mesmo tipo de população celular.

6.2.6. Separação de populações positivas para a atividade de aldeído-desidrogenase (ALDH) através de citometria de fluxo

A análise da atividade de ALDH baseada na intensidade de fluorescência de cada célula exibiu um resultado semelhante entre três das quatro amostras avaliadas (Figura 29). As populações que apresentaram uma maior atividade de aldeído-desidrogenase corresponderam a 1,0%, 0,23% e 1,5% para as amostras 005/13, 025/14 e 028/14, respectivamente. Apenas a amostra 020/14 mostrou uma maior quantidade de células ALDH^{hi}, que corresponderam a 7,2% do total de células analisadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagens de células ALDH⁺ nas quatro amostras de carcinomas mamários caninos

	005/13	020/14	025/14	028/14
Nº eventos	10000	10000	10000	10000
ALDH⁺	102	723	23	148
% total	1,0	7,2	0,23	1,5

Figura 29 - Análise das populações de células com maior atividade de aldeído-desidrogenase

(Continua)

(Continuação)

(Continuação)

(Conclusão)

Fonte: LOCT/USP

Legenda: a atividade de ALDH baseada na intensidade de fluorescência de cada célula exibiu um resultado semelhante entre as amostras 005/13, 025/14 e 028/14, que apresentaram porcentagens pequenas de células com maior atividade de aldeído-desidrogenase. Apenas a amostra 020/14 mostrou uma maior quantidade de células ALDH^{hi}.

Quanto ao potencial de auto-renovação pela formação de tumoresferas em condições de baixa aderência, três das quatro amostras apresentaram diferença significativa para atividade de ALDH e número de esferas formadas após sete e quatorze dias de cultivo. Nas amostras 005/13 e 020/14, a população ALDH^{hi} demonstrou maior capacidade de formação de esferas *in vitro*, sendo que a amostra 005/13 foi a que apresentou um número mais alto de tumoresferas após os quatorze dias de experimento (Gráfico 7). As células tumorais do cultivo 020/14 também geraram esferas principalmente no grupo ALDH^{hi}, porém em menor quantidade, e em ambas as contagens (Gráfico 8). Ao contrário, na amostra 025/14, a população em que houve uma maior formação de tumoresferas foi aquela com menor expressão de aldeído-desidrogenase, tanto para a primeira contagem (dia 7) quanto na segunda contagem (dia 14) (Gráfico 9). Não houve diferença estatística para a amostra 028/14 em nenhum dos tempos analisados. Também não houve formação de tumoresferas no 14^o dia de experimento (Gráfico 10).

Gráfico 7 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH^{low} e ALDH^{hi}, amostra 005/13

Fonte: LOCT/USP

Legenda: nota-se diferença significativa (* $p < 0,05$) na formação de tumoresferas da população ALDH^{hi} na amostra 005/13, na segunda semana de experimento. Avaliação através de análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste Bonferroni.

Gráfico 8 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH^{low} e ALDH^{hi}, amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: nota-se diferença significativa (* $p < 0,05$) na formação de tumoresferas da população ALDH^{hi} na amostra 020/14, após 7 dias de experimento. Avaliação através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 9 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações ALDH^{low} e ALDH^{hi}, amostra 025/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: nota-se diferença significativa (* $p < 0,05$) na formação de tumoresferas em ambos os tempos de experimento da população ALDH^{low} na amostra 025/14. Avaliação através de análise de variância em duas vias (ANOVA) seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni.

Gráfico 10 - Ensaio de formação de esferas em cultivo de baixa aderência em populações $ALDH^{low}$ e $ALDH^{hi}$, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: formação de tumoresferas no 7º dia de experimento. Não foi possível a análise estatística, pois os valores do grupo são idênticos. Nenhuma esfera foi formada nas condições de baixa aderência no 14º dia de experimento.

Figura 30 - Formação de tumoresferas, amostra 020/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: formação de esferas em condições de baixa aderência para os grupos ALDH^{low} (-) e ALDH^{hi} (+) aos sete e quatorze dias de experimento. Aumento 100x. Escala = 100µm.

Figura 31 - Agregados celulares formados a partir do sétimo dia, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: amostra 028/14 exibindo aglomerados de células formados nas mesmas condições de crescimento de tumoresferas. Estes grupos não entraram na contagem de esferas ou análise estatística. Aumento 100x. Escala = 100µm

A análise da validação para potencial de auto-renovação e formação de tumoresferas *in vitro* foi realizada somente pela contagem do número de esferas nos poços destinados a cultura de cada população, ALDH^{low} e ALDH^{hi}. Não foram considerados o tamanho das esferas formadas.

6.2.7. Separação de populações celulares por beads magnéticas através do perfil de expressão de CD24/CD44

Depois de estabilizado o cultivo celular em monocamada, ou seja, todas as colônias de células em condições de aderência e em proliferação, as quatro amostras de carcinomas mamários oriundas da dissociação tumoral foram submetidas à separação de populações quanto à expressão dos marcadores de membrana CD24 e CD44. A técnica demonstrou ser eficaz na separação entre células marcadas e não marcadas para o anticorpo proposto. Todos os testes feitos obtiveram resultados satisfatórios: porcentagem reduzida de células mortas, e, aquelas que foram separadas positivamente, permaneceram viáveis quando colocadas em cultivo novamente. Os resultados mostram que, as quatro amostras analisadas apresentaram um maior número de células positivas para CD44 quando comparado à população CD24⁺. A média de células CD24⁺ variou entre 0,04 e 0,35% enquanto que as células CD44⁺ variaram entre 1,75 a 8,56% do total analisado, correspondendo a mais de seis vezes o número de CD24⁺. Os dados estão representados na tabela 5.

Tabela 5 - Quantificação das populações CD24 e CD44 através da separação por *beads* magnéticas, em neoplasia mamária de cães

(Continua)

		CD24		CD44	
		+	-	+	-
<u>005/13</u>	Média	0,11	99,88	1,75	98,25

					(Conclusão)
	D.P.	0,07	0,07	1,02	1,02
<u>020/14</u>	Média	0,35	99,65	8,56	91,44
	D.P.	0,06	0,06	4,73	4,73
<u>025/14</u>	Média	0,12	99,87	2,42	97,58
	D.P.	0,10	0,10	1,60	1,60
<u>028/14</u>	Média	0,04	99,96	2,03	97,97
	D.P.	0,04	0,04	1,40	1,40

Fonte: LOCT/USP

Legenda: na tabela estão representados a média e o desvio padrão (D.P.) das replicatas analisadas na separação de populações enriquecidas para os fenótipos CD24 e CD44. Os valores apresentados foram ajustados conforme a população de células viáveis.

Ainda, as células separadas após cada experimento foram levadas ao cultivo celular, para validação quanto à formação de tumoresferas em condições de baixa aderência (Figura 32). O número de esferas utilizado para análise estatística foi aquele obtido apenas na contagem realizada no sétimo dia desde o início do experimento, uma vez que a variação no tempo entre as contagens não teve valor significativo entre os grupos, portanto, não considerado na presente avaliação.

A análise estatística apresentou uma diferença significativa no crescimento de tumoresferas para o marcador CD44 nas amostras 020/14 e 025/14, onde a população CD44⁺ exibiu um maior número de esferoides no cultivo de baixa aderência. Para a amostra 005/13, o grupo CD44⁻ foi o que mostrou mais tumoresferas ao sétimo dia de experimento (Gráfico 12). Também, houve variação significativa nas populações positivas e negativas para a marcação de CD24, em que o fenótipo CD24⁻ exibiu maior crescimento de tumoresferas nas amostras 005/13 e 025/14, e o fenótipo CD24⁺ apresentou crescimento considerável no cultivo 028/14 (Gráfico 11). Não houve diferença estatística entre o número de esferas nas populações CD24 positiva e negativa para a amostra 020/14, e CD44 positiva e negativa para a amostra 028/14. Nesta última, o fenótipo CD44⁺ exibiu um aumento no crescimento de esferas em uma das replicatas do experimento.

Gráfico 11 – Avaliação do crescimento de tumoresferas após a separação para os fenótipos CD24⁻ e CD24⁺

Legenda: comparação entre as populações CD24 positiva e negativa quanto ao número de esferas formadas após sete dias de experimento. Os resultados mostram maior crescimento de esferoides no fenótipo CD24⁻ em duas das quatro amostras analisadas, amostra 005/13 e 025/14. Aumento observado também no fenótipo CD24⁺ para a amostra 028/14. Não houve diferença estatística entre as populações positivas e negativas para CD24 no cultivo 020/14. Teste t de Student (*p<0,05).

Gráfico 12 - Avaliação do crescimento de tumoresferas após a separação para os fenótipos CD44⁻ e CD44⁺

Legenda: comparação entre as populações CD44 positiva e negativa quanto ao número de esferas formadas após sete dias de experimento. Os resultados mostram maior crescimento de esferoides no fenótipo CD44⁺ em duas das quatro amostras analisadas, amostra 020/14 e 025/14. Aumento observado também no fenótipo CD44⁻ para a amostra 005/14. Não houve diferença estatística entre as populações positivas e negativas para CD44 no cultivo 028/14. Teste t de Student (*p<0,05).

Figura 32 - Formação de esferas em cultivo de baixa aderência após as separações por *beads* magnéticas

Fonte: LOCT/USP

Legenda: tumoresferas formadas no cultivo de baixa aderência após o *sorting* magnético para separação de fenótipos CD24 e CD44 positivos e negativos. Não estão especificados os grupos em cada foto, uma vez que todos apresentaram um crescimento semelhante. Não foram considerados os tamanhos das esferas formadas em cada grupo. Aumento 100x. Escala = 100µm

Figura 33 - Aglomerado de células em proliferação, amostra 028/14

Fonte: LOCT/USP

Legenda: nota-se um grande agrupamento de células, possivelmente se tratando de células isoladas, e não de um crescimento em esfera propriamente dito. Estes agrupamentos não foram considerados na contagem, e foram observados somente na amostra 028/14. Aumento 100x. Escala = 100µm.

A comparação entre os tamanhos das esferas formadas durante os dias de experimento não foi realizada na presente análise. Os cultivos foram mantidos durante quatorze dias ao total, mas a variação entre o número de esferas formadas entre a primeira (dia 7) e última (dia 14) contagem não foi significativa.

7 DISCUSSÃO

As neoplasias mamárias em cadelas ainda é um problema emergente em países como o Brasil, onde a carência no tratamento, e principalmente, na prevenção da doença faz com que os índices de incidência e mortalidade ainda sejam números surpreendentes, ano após ano. Neste estudo, verificamos que as neoplasias malignas mamárias, em especial os carcinomas, foram as mais frequentes entre os animais com amostras coletadas no presente trabalho. Assim como em mulheres, os níveis hormonais exercem grande influência na iniciação, promoção e progressão tumoral de neoplasias mamárias em cadelas, principalmente em neoplasias de origem epitelial, onde quase 80% destes tumores são responsivos ao estrógeno (SORENMO; SHOFRER; GOLDSCHMIDT, 2000). Deste modo, animais de meia idade a idosos, não castrados, e/ou que receberam algum tipo de hormônio exógeno para controle reprodutivo, são candidatos em potencial ao diagnóstico de câncer de mama. Baseado neste fato, a castração em animais jovens é considerada o método mais eficaz para evitar o desenvolvimento deste tipo de neoplasia: se castrados até o primeiro cio, o risco destas fêmeas virem a desenvolver a doença é de apenas 0,5%. Porém, se a cirurgia for realizada tardiamente (após o 2º cio), as chances aumentam para 26% (SCHNEIDER; DORN; TAYLOR, 1969), evidenciando a necessidade da implementação de programas de conscientização voltados aos proprietários de fêmeas para a castração precoce de seus animais.

Sendo assim, este acúmulo de fatores de risco durante a vida de cada animal, não só por fatores hormonais, mas também dieta, meio ambiente, predisposição genética e acúmulos de mutações, faz com que raramente sejam diagnosticados tumores de glândula mamária em cães abaixo de 2 anos de idade. A curva de incidência torna-se ascendente a partir dos 5 anos, atingindo picos entre os 8 a 12 anos de idade, para então entrar em declínio, como evidenciado em estudos epidemiológicos realizados nos últimos 40 anos (MULLIGAN, 1975; ZATLOUKAL; KOHOUT; REPUBLIC, 2005; MERLO et al., 2008; FILHO et al., 2010). Resultados que são congruentes com os verificados neste trabalho. Com relação à predisposição racial, ainda não se pode afirmar que determinadas raças sejam mais propensas a desenvolver tumores mamários do que outras, uma vez que este índice

pode estar relacionado com a preferência e distribuição racial de cada região geográfica; porém, há relatos de tendência do aumento de casos de neoplasias de glândula mamária em raças como Poodle, Pinscher, Cocker Spaniel e Daschund, frequentes em trabalhos realizados tanto no Brasil como no exterior (SORENMO, 2003; FILHO et al., 2010). Neste estudo, os animais sem raça definida (SRD) foram os mais acometidos, o que pode ser explicado pelo predomínio de cães mestiços da região onde foram coletadas as amostras. Estes resultados estão de acordo com outros estudos brasileiros, que também apresentaram SRDs como a população dominante dos casos avaliados (FONSECA, 1999; HATAKA, 2004; FILHO et al., 2010).

Neste estudo, a maior parte dos animais apresentava mais de um nódulo no momento da cirurgia, corroborando com a literatura, que mostra que fêmeas caninas podem apresentar múltiplas nodulações, e em alguns casos, estas nodulações pertencem a tipos histológicos distintos (MOULTON, 1990). A maioria dos casos se tratava de carcinomas, sendo que os tipos histológicos mais frequentes foram os carcinomas complexos, mistos e sólidos. Também, a procedência dos cultivos utilizados no trabalho teve quase que a totalidade de carcinomas mistos, exceto por um comedocarcinoma, correspondente a amostra 005/13. Os carcinomas mistos caracterizam-se pela presença de três ou mais populações (epitelial, mioepitelial e metaplasias cartilaginosa ou óssea) de células suportadas por um estroma fibrovascular. Histologicamente, ainda há uma controvérsia sobre a origem do tecido cartilaginoso e/ou ósseo formado durante o desenvolvimento dos tumores mistos: se este seria proveniente do componente epitelial (ALLEN, 1940), da metaplasia do tecido conectivo (PALMER; MONLUX, 1979), ou ainda, das células mioepiteliais que compõem a camada basal da glândula mamária (TATEYAMA; COTCHIN, 1978). Porém, evidências reforçam o papel das células mioepiteliais nas metaplasias mesenquimais, que por algum mecanismo desconhecido, promoveriam a transformação em cartilagem e osso, resultando numa aparência histológica heterogênea (GÄRTNER et al., 1999). Já os comedocarcinomas, são neoplasias extremamente agressivas, que apresentam focos de necrose em meio ao tecido tumoral e estroma adjacente (GOLDSCHMIDT et al., 2011). Estes focos de necrose nos tecidos tumorais podem caracterizar uma grande taxa de proliferação das células neoplásicas, significando clinicamente tumores menos diferenciados e com

maior potencial de metastatização, apresentando um pior prognóstico (FRANCO, 1997).

A análise citogenética dos tumores é importante para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias humanas e veterinárias (HAHN et al., 1994; FRIEDLANDER; HEDLEY; TAYLOR, 2006; GRIMWADE et al., 2015). No presente estudo, as quatro amostras selecionadas para caracterização do cultivo celular *in vitro* apresentaram aspectos diferentes quanto ao perfil citogenético, relacionado à variação do número e aparência dos cromossomos das células avaliadas. O cariótipo da espécie *Canis lupus familiaris* é considerado um dos mais complexos e difíceis de serem estudados, principalmente devido ao tamanho e estrutura de todos os cromossomos autossômicos, que consistem em 76 cromossomos acrocêntricos muito semelhantes em comprimento, com exceção do primeiro par, que apresenta um comprimento parecido com o cromossomo X, sendo facilmente identificado (REIMANN et al., 1999). Somente em 1996 chegou-se a um consenso sobre a nomenclatura dos cromossomos caninos, entretanto, as recomendações exatas sobre o uso de uma nomenclatura específica para a descrição de aberrações cromossômicas no cariótipo canino ainda não foram alcançadas (REIMANN et al., 1996).

Alterações numéricas em células tumorais já foram relatadas na espécie canina. Mayr et. al. realizaram estudos citogenéticos em uma série de neoplasias em cães. Em hemangiopericitoma, hemangiotelioma e sarcoma espinocelular, encontraram aneuploidia em grande parte das metáfases analisadas, em consequência de polissomias, no caso de células hiperdiploides, e fusões cêntricas ou isocromossomos, reduzindo o número final de cromossomos em células hipodiploides (MAYR et al., 1994). As fusões cêntricas consistem na união dos centrômeros de dois cromossomos acrocêntricos distintos dando origem a um metacêntrico único, levando a uma diminuição de cromossomos no número final da célula. Mas, apesar disso, indivíduos que apresentam fusões cêntricas geralmente têm genoma completo e fenótipo normal. Já os isocromossomos, menos frequentes, surgem a partir de um rompimento longitudinal do centrômero e paralelo às cromátides, fazendo com que os dois braços idênticos se liguem a um mesmo centrômero, de modo que cada braço contenha a mesma ordem de genes (NICHOLAS, 2012). Em um estudo com osteossarcomas, a fusão cêntrica foi um

achado comum entre todos os animais estudados, e nenhuma célula apresentou metáfase com $2n=78$. No mesmo trabalho, a alteração do número de cromossomos entre os pacientes diagnosticados com o mesmo tipo de tumor foi diferente, onde um animal exibiu células hiperdiploides, e no outro, as células eram todas hipodiploides (MAYR et al., 1991a). Achados semelhantes foram encontrados em melanomas orofaríngeos e em um caso de melanoma cutâneo canino. Todos apresentaram aneuploidias com alterações estruturais características de fusões cênicas e um isocromossomo isolado i(12), estando de acordo com os dados também descritos para melanomas em humanos (MAYR; SCHLEGER; LOUPALT, 1992; HÖRSTING et al., 1999).

Em neoplasias de glândula mamária em cães, nossos dados mostraram resultados semelhantes àqueles publicados em literatura. Todas as amostras analisadas por coloração convencional (Giemsa) exibiram aneuploides, mas sem um padrão definido. Com exceção da amostra 028/14, todas apresentaram células hipodiploides e hiperdiploides, sendo que, na 005/13 e 025/14 a maior parte correspondia ao valor diploide normal ($2n=78$). Em relação a alterações estruturais, a amostra 028/14 foi a que apresentou modificações muito evidentes, como diversos pares de cromossomos metacêntricos e uma consequente redução no número total de cromossomos em todas as metáfases analisadas. Os resultados corroboram com os de Mayr et.al. em sarcomas e adenocarcinomas mamários caninos, realizados em tumores recém-dissociados e cultivos primários. Entre os achados, estão a fusão cêntrica ou isocromossomo no par 13, resultando em cromossomos metacêntricos e simétricos; monossomia dos pares 4 e 6; trissomia no par 3; monossomia do cromossomo X, entre outros (MAYR et al., 1991b, 1994; MAYR; SCHLEGER; LOUPALT, 1992). Talvez, o cariótipo do cão suporte a perda de cromossomos durante o processo de transformação e progressão tumoral sem a perda da viabilidade celular com mais frequência do que o cariótipo no homem. Segundo Rutteman et. al., que realizaram análise de ploidia em neoplasias mamárias em cadelas, os genes que codificam para as funções celulares vitais em cães são distribuídos em um maior número de cromossomos, permitindo assim que as células caninas superem a perda cromossômica de uma forma menos significativa (RUTTEMAN et al., 1988). Mesmo assim, esta perda de cromossomos é um fator

importante para a geração de um fenótipo maligno de células, uma vez que podem implicar a perda de genes supressores de tumor e reparadores de danos no DNA.

Uma vez iniciado, o desenvolvimento e a progressão do tumor mamário será influenciado por diversos fatores, especialmente de qual local e a que grupo pertencem as células que deram origem à neoplasia. Normalmente, se originam a partir de lesões benignas, sendo muito comum um carcinoma ou um sarcoma se desenvolverem a partir de um tumor misto benigno ou mesmo de lesões pré-neoplásicas, como as hiperplasias ductais ou lobulares. A possibilidade de se estabelecer um diagnóstico específico, ou mesmo um marcador prognóstico que seja expresso nesta fase de transição, seria extremamente bem vinda, visto que cerca de 70% dos sarcomas e 30% dos carcinomas dão origem a metástases e formação de tumores secundários (HELLMÉN, 2005).

Os filamentos intermediários (FI) representam um dos três principais polímeros fibrosos da célula e atuam como suportes do citoesqueleto no núcleo e no citoplasma (ALBERTS, 2002). São expressos nas células em maior ou menor quantidade, dependendo do tecido de origem. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que um tumor expressava apenas um tipo de FI; os carcinomas expressariam apenas citoqueratinas, enquanto que neoplasias mesenquimais teriam a expressão somente de vimentina. Entretanto, apesar deste padrão de expressão ainda ser uma tendência, atualmente se sabe que um mesmo tumor pode coexpressar dois ou mais tipos de filamentos intermediários ao mesmo tempo. Frequentemente, quando há coexpressão de FIs, a vimentina está presente na maioria dos casos (BROERS et al., 1988). Neste estudo, verificamos diferentes padrões de expressão dos três principais FIs utilizados na caracterização de células tumorais: citoqueratinas (CK) de diferentes pesos moleculares, identificados pelo mesmo clone A1/A3 (especificamente CKs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 15, 16 e 19); vimentina; e por fim, actina de músculo liso, representada pela α -sma. Desde o início, as amostras 005/13 e 025/14, com células de morfologia mais alongada, apresentaram coexpressão de citoqueratina e vimentina no cultivo celular, sendo a vimentina expressa em todas as células homogeneamente, enquanto que a citoqueratina expressava de forma heterogênea. Também, notamos a marcação para α -sma, da mesma forma que a citoqueratina: distribuição heterogênea. No caso das amostras 020/14 e 028, verificamos uma diminuição na expressão de vimentina com o aumento das

passagens, sendo que nas células da amostra 020/14, assim que o cultivo assumiu uma morfologia epitelial, não apresentou marcação para este interfilamento. Esta diminuição na marcação de vimentina pode ser consequência da seleção de uma população celular durante o cultivo de células, ou do decréscimo da expressão do interfilamento sem mudanças na natureza do cultivo celular.

As queratinas são uma família de filamentos intermediários expressos diferencialmente no epitélio, e fornecem marcadores únicos e específicos para estudos sobre diferenciação epitelial. As células basais e lumbais dentro epitélio mamário expressam queratinas bem definidas, em fenótipos *in vitro* e *in vivo* (TAYLOR; LANE, 1981; O'HARE et al., 1991). A vimentina é um marcador estável de células mesenquimais, como os fibroblastos, e também já foi descrita como presente nas células mioepiteliais, que formam a camada basal do epitélio glandular. Além da vimentina, a expressão de α -actina de músculo liso e a miosina já foram caracterizadas na expressão de células mioepiteliais tanto em tecido mamário adulto, como no infantil (GUSTERSON et al., 1982; GUELSTEIN et al., 1988; GOULD et al., 1990; ANBAZHAGAN et al., 1991). Em humanos, a expressão de FI na glândula mamária está associada com uma variedade de aspectos, no desenvolvimento fetal da mama, diferenciação celular pela interferência hormonal, e a progressão de uma neoplasia (ANBAZHAGAN et al., 1991; OSIN et al., 1998).

Nos últimos anos, tem-se relacionado a coexpressão de vimentina e citoqueratina em carcinomas mamários com uma maior malignidade tumoral, principalmente pela associação com a transição epitélio-mesenquimal (EMT) responsável pela invasão do tecido adjacente e disseminação das células neoplásicas. O subtipo tumoral que corresponderia a este grau de agressividade devido às altas taxas de invasão e metástase seria aquele referido como triplo-negativo, ou *basal-like*. Desde modo, a EMT a nível celular nestes tumores seria caracterizada pela perda de adesão intercelular (E-caderina e ocludinas); baixa regulação dos marcadores epiteliais (citoqueratinas); aumento da regulação de marcadores mesenquimais (vimentina e α -actina de músculo liso); aquisição de uma morfologia celular fusiforme, semelhantes a fibroblastos, através da reorganização do citoesqueleto; e aumento da mobilidade, invasão e capacidade metastática das células. Boa parte destas características foram verificadas nos estudos imunocitoquímicos realizados nos cultivos primários deste trabalho, mesmo para

aquelas amostras que perderam a expressão de vimentina após o aumento no número de passagens, como foi o caso da amostra 020/14. Em 2008, Sarrió et. al. em um estudo com a linhagem celular MCF10, apresentou dados que corroboram com a hipótese de que as modificações EMT-*like* acontecem preferencialmente no subtipo basal do câncer de mama (SARRIÓ et al., 2008). Entretanto, nossos dados não permitiram a confirmação da origem luminal ou basal das células obtidas no cultivo primário pela marcação da citoqueratina específica de cada subtipo celular. Apenas a expressão de alfa-actina muscular presente nas amostras 005/13 e 025/14 sugere que pertençam à camada basal do epitélio.

Grande parte dos estudos que envolvem associação da expressão de IF em neoplasias mamárias são realizados através de análise imunohistoquímica. Uma vez em cultivo, as células tendem a modificar o citoesqueleto em resposta às condições do meio, e de confluência nas placas de cultura. Portanto, os modelos *in vitro* que são utilizados para o estudo de EMT sofrem de várias limitações. Em alguns modelos, a EMT é realizada de forma incompleta ou lenta, levando vários dias para a conclusão. Poucos tipos celulares de carcinoma com um fenótipo epitelial bem definido podem realizar a EMT *in vitro*, talvez porque o processo de transição seja muito sensível às condições de cultura, incluindo os substratos do meio e a presença ou ausência de soro fetal bovino (THIERY, 2002). Mesmo assim, o cultivo de células que apresentam características semelhantes às descritas no processo de transição epitélio-mesenquimal, naturalmente ou de forma induzida, ainda é um método de extrema importância para o entendimento de como este processo estaria envolvido na invasão e metástase de neoplasias agressivas, uma vez que somente com estudos histológicos não é possível avaliar o comportamento tumoral acessado através das células vivas, e as modificações as quais estas células são submetidas, mimetizando a progressão do tumor *in vivo*.

A heterogeneidade e a complexidade biológica e molecular do câncer, principalmente de tumores sólidos, como o câncer de mama, apresentam muitos desafios para o desenvolvimento de estratégias eficazes para prevenir e tratar esta doença. Por este motivo, estudos vêm dando cada vez mais crédito para a hipótese das células-tronco cancerosas (CSCs), que, se estiver correta, fornecerá uma explicação para muitos fatores ainda limitantes no conhecimento do desenvolvimento e progressão tumoral. O modelo de desenvolvimento baseado em

CSCs consiste fundamentalmente na ideia de que o câncer seria originado a partir de uma desregulação nas vias de auto-renovação de células-tronco e/ou progenitoras no tecido normal (REYA et al., 2001). Como consequência, as neoplasias teriam um componente celular chave, que manteria as suas propriedades de células-tronco, incluindo a auto-renovação, dando início e conduzindo a carcinogênese e diferenciação, embora aberrante, contribuindo assim para a heterogeneidade tumoral (GUPTA; CHAFFER; WEINBERG, 2009). A principal dificuldade encontrada no estudo e caracterização das CSCs, admitindo que esta teoria seja de fato a origem do câncer, é a identificação de um marcador único e exclusivo desta população tumoral que permita o isolamento somente das CSCs. Até hoje, nenhum marcador utilizado para o isolamento das células-tronco normais e neoplásicas de diversos tecidos são expressos somente pelas células-tronco; isto é válido não só para marcadores de membrana, conhecidos como CDs (do inglês *Cluster of Differentiation*), mas também para ensaios de funcionalidade, como os níveis de metabolismo de enzimas ou transportadores envolvidos no processo de detoxificação, como é o caso do ensaio Aldefluor® e Side Population.

O ensaio de formação de esferas, uma técnica *in vitro* onde a proliferação celular resulta em um produto de arquitetura esferoide, juntamente com a avaliação de tumorigênese *in vivo* é um dos principais métodos de validação da presença de CSCs em cultivo primário ou linhagens estabelecidas. É muito utilizado em trabalhos realizados com diversos tipos de tumores sólidos, para a validação de marcadores, testes de quimioresistência, estudo das vias de transição epitélio-mesenquimal, entre outros (SINGH et al., 2003; FILLMORE; PONTI et al., 2005; KUPERWASSER, 2008; TROPEPE et al., 2000; WELLNER et al., 2009). No caso de neoplasias mamárias, as células normais ou tumorais que iniciam as tumoresferas quando colocadas em condições independentes de ancoragem, têm propriedades de células-tronco e são capazes de auto-renovação *in vitro*, bem como de se diferenciar em todos os subtipos celulares encontrados na glândula mamária (PONTI et al., 2005; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008; KAKARALA; WICHA, 2008;).

No presente estudo, as quatro amostras de células obtidas a partir do cultivo primário de carcinomas mamários em cães apresentaram formações em tumoresferas no cultivo de baixa aderência. Existem poucos trabalhos publicados na literatura que descrevem o isolamento e caracterização de CSCs em tumores

mamários caninos, sendo a maior parte realizada em linhagens pré-estabelecidas e não em cultivos primários, sendo que o primeiro deles a isolar esta subpopulação foi realizado em 2009. Neste trabalho, Cocola et. al. demonstraram que tanto as células dissociadas de tecidos tumorais quanto saudáveis foram capazes de gerar esferas sob as condições adequadas, sem observar diferença morfológica entre os dois grupos (COCOLA et al., 2009). A definição de um marcador que otimize a separação da população de CSCs em neoplasias mamárias em cães, entretanto, ainda permanece indefinida. Mesmo para aqueles marcadores que já foram bem documentados em estudos humanos, como é o caso do fenótipo $CD24^{-}/low/CD44^{+}/high$, a marcação $CD133^{+}$, a maior expressão de aldeído-desidrogenase e o isolamento pelo método *Side Population* (AL-HAJJ et al., 2003; PATRAWALA et al., 2005; PONTI et al., 2005; GINESTIER et al., 2007; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2009), nos tumores caninos, apresentou uma diferença nos resultados não só quando comparados à literatura humana, mas também entre os animais de um mesmo estudo.

Por exemplo, nossos dados mostram que, duas em quatro amostras apresentaram um maior crescimento de esferas no grupo $ALDH^{hi}$, como foi o caso das amostras 005/13 e 020/14; já no cultivo 025/14, a maior expressão de aldeído-desidrogenase não foi um fator determinante no ensaio em baixa aderência. Estes resultados corroboram com o estudo de Michishita et. al. realizado em 2012, que avaliaram o potencial de auto-renovação em linhagens de carcinomas mamários caninos. Três das quatro amostras analisadas apresentaram uma maior formação de esferas na população $ALDH^{hi}$, enquanto que uma linhagem não apresentou diferenças significativas entre os grupos $ALDH^{low}$ e $ALDH^{hi}$. Também, não houve alteração na expressão gênica de $ALDH1A1$ entre a população positiva e negativa da linhagem que apresentou uma maior porcentagem de expressão no ensaio Aldefluor® (MICHISHITA et al., 2012). Em outro estudo, realizado em linhagens de melanoma humano isoladas de sítios metastáticos, com elevado grau de agressividade, a maior atividade de ALDH foi encontrada em quase 90% das células avaliadas, porém sem diferenças na tumorigenicidade entre as populações $ALDH^{low}$ e $ALDH^{hi}$ quando da injeção em camundongos nude (PRASMICKAITE et al., 2010).

Em 2006, um Workshop realizado pela *American Association of Cancer Research*, e publicado por Michael Clarke et. al. sobre o tema “*Cancer Stem Cells —*

Perspectives on Current Status and Future Directions” afirmava que nesta teoria de desenvolvimento tumoral, as CSCs seriam uma subpopulação muito pequena, apenas um reservatório de células que teriam como função a manutenção do tumor (CLARKE et al., 2006). No entanto, demonstrou-se através dos resultados obtidos nos experimentos publicados até 2009 sobre as CSCs, que a proporção de CSCs pode diferir entre os vários tipos de tumores (GUPTA; CHAFFER; WEINBERG, 2009). Esta variação também pôde ser encontrada na comparação entre os resultados do presente trabalho, e o estudo de Michishita et. al. comentado anteriormente. Nossos dados apresentaram uma variação na expressão de ALDH partindo de 0,23%, na amostra 025/14, a 7,2% na amostra 020/14, enquanto que nos resultados publicados na literatura, a porcentagem de células com alta expressão de ALDH variou de 5,1% a 49,1% entre as amostras analisadas (MICHISHITA et al., 2012).

Além da expressão de ALDH, a maioria dos estudos atuais tem enfatizado a identificação de subpopulações de células-tronco cancerosas em câncer de mama a partir da expressão de marcadores de membrana como CD44 e CD24. O primeiro relato de isolamento de uma subpopulação com alto potencial tumorigênico verificou que células com expressão do fenótipo CD24⁻ ou CD44⁺ apresentavam um maior crescimento de tumores em camundongos NOD/SCID do que aquelas CD24⁺ e CD24⁻. Ainda, quando associadas as duas marcações, o grupo CD24⁻/CD44⁺ era capaz de formar nódulos com uma menor quantidade de células injetadas, do que quando avaliados de forma isolada (AL-HAJJ et al., 2003). A partir de então, vários trabalhos em humanos e cães se basearam na expressão destes marcadores na caracterização desta subpopulação como possíveis células-tronco cancerosas mamárias (DONTU et al., 2003; PONTI et al., 2005; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008; FERLETTA; GRAWÉ; HELLMÉN, 2011). No presente estudo, procuramos avaliar a capacidade na formação de tumoresferas em células de cultivo primário de carcinomas mamários caninos, não só através da atividade de ALDH, mas também a fim de verificar se a expressão de CD24 ou CD44 poderia selecionar subpopulações enriquecidas com CSCs no ensaio *in vitro*. O método escolhido foi a separação através de *beads* magnéticas, que apesar de menos frequente para este tipo de estudo, já foi utilizado em literatura no isolamento de populações CD24 e CD44

positivas e negativas a partir de células tumorais para análises de CSCs e invasividade (LEELAWAT et al., 2013; SHEN et al., 2013).

Assim como os resultados obtidos a partir da expressão de ALDH, o crescimento de esferas no cultivo de baixa aderência diferiu entre os fenótipos avaliados. Duas em quatro amostras apresentaram crescimento significativo na população CD44⁺ quando comparada às demais, e, na amostra 025/14, o grupo CD24⁻ também exibiu maior número de tumoresferas no cultivo de baixa aderência, conforme o esperado. A expressão de CD44 em células tumorais caninas talvez esteja intimamente associada à proliferação celular em cultura, sendo que essa expressão transitória e flutuante pode interferir na sua utilidade como um marcador de CSCs (BLACKING; WATERFALL; ARGYLE, 2011). Esta discrepância na expressão e potencial de formação de colônias *in vitro* foi relatada em linhagens tumorais de neoplasias mamárias em humanos, bem como na avaliação da expressão de marcadores comuns de CSCs em células dissociadas a partir de tumores primários. Verificou-se que a expressão de CD44, CD24, ALDH, ESA, CD133, CXCR4 e PROCR tanto em *in vivo* quanto *in vitro*, diferiu substancialmente entre as linhagens de células pré-estabelecidas de câncer de mama, bem como nos tumores primários, sugerindo que os marcadores previamente reconhecidos para as células-tronco do câncer de mama podem não ser os marcadores ideais ou universais para a identificação de populações de células-tronco do câncer nos diversos tipos histológicos reconhecidos (HWANG-VERSLUES et al., 2009).

Uma questão fundamental é se os diferentes subtipos histológicos do câncer de mama são derivados de uma mesma origem, ou de origens distintas. Células-tronco cancerosas com características distintas em cada subtipo poderiam explicar porque eles diferem não só morfolologicamente, mas também em graus de invasão e metástase, bem como no prognóstico e resposta ao tratamento de cada neoplasia. A expressão de ALDH, por exemplo, já foi relacionada a um alto grau de agressividade do tumor, sem necessariamente implicar em um maior crescimento de tumoresferas no grupo ALDH^{hi} para todos os tipos de neoplasias (PRASMICKAITE et al., 2010), provavelmente devido à função específica de cada isoforma resultante da expressão do gene ALDH. No câncer de mama humano, já foram descritos 19 isoformas diferentes de ALDH, em que a progressão tumoral em diferentes subtipos tumorais era influenciada não só por uma isoforma específica; e cada uma delas teria um

potencial diferente para promover um aumento na atividade do teste Aldefluor®, se expressas em níveis suficientes (MARCATO et al., 2011). Associando o fato de que a maior atividade de ALDH teria uma grande influência principalmente em subtipos mais agressivos, e de que diferentes isoformas agem de maneiras distintas na progressão de cada subtipo tumoral, a literatura daria suporte aos dados encontrados neste trabalho; a amostra 005/13, que apresentou um maior número de tumoresferas no grupo ALDH^{hi}, pertence a um subtipo tumoral mais agressivo, o dos comedocarcinomas. Assim, mesmo sem expressar uma grande porcentagem de células com alta atividade de ALDH, aquelas que de fato expressavam, promoveram um crescimento significativo de esferas quando colocadas em condições específicas. Ainda, sabe-se que uma das funções da enzima aldeído-desidrogenase é a conversão do retinol em ácido retinóico, que tem papel importante na diferenciação celular de células-tronco neurais e hematopoiéticas (MARCATO et al., 2011). Portanto, uma baixa atividade de ALDH, seja fisiológica ou induzida, levaria a uma diminuição nos níveis de ácido retinóico e um consequente aumento de células indiferenciadas, tais como as células-tronco. Esta função permitiu o desenvolvimento de um fármaco eficaz em casos de leucemia aguda, o *all-trans-retinoic-acid* (ATRA), que promove diferenciação das células tumorais e induz apoptose. Em câncer de mama, Ginestier et. al. demonstraram que a adição de ATRA em cultivos de células tumorais mamárias leva a uma diferenciação celular *in vitro*, observada através da diminuição na formação de tumoresferas (GINESTIER et al., 2009).

A variação encontrada no crescimento de esferas em populações separadas a partir de marcadores comuns de células-tronco cancerosas mamárias em humanos nos permite pensar que a comparação entre CSCs e não-CSCs talvez não seja a melhor forma de finalmente caracterizarmos esta população como sendo uma população única; talvez, estejamos diante não só de diferentes populações de células tumorais mamárias. Mas também, de diferentes grupos de células iniciadoras tumorais, que levariam a diferentes subtipos de câncer de mama, e que estas células poderiam às vezes até coexistir dentro de um mesmo tumor. Neste estudo verificamos que neoplasias de uma mesma classificação histológica, no caso três adenocarcinomas mistos, diferiram nas características morfológicas e citogenéticas avaliadas, bem como na expressão de marcadores normalmente utilizados no isolamento de CSCs em câncer de mama, apesar de todos os cultivos terem sido

mantidos sob as mesmas condições de meio de cultura e processamento de dissociação primária. Assim, populações celulares diferentes seriam responsáveis pela formação e desenvolvimento dos tumores sólidos. A definição da forma com que acontece a progressão neoplásica permitiria o aprimoramento de terapias e estratégias de prevenção da doença.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a possibilidade do uso da oncologia comparada na pesquisa em oncologia básica, em busca da compreensão da origem, desenvolvimento e organização dos tumores sólidos, especialmente em neoplasias mamárias. O câncer de mama em cães, que apresenta uma grande variedade e complexidade assim como em humanos, se apresenta como uma ferramenta em potencial para o estudo das vias hierárquicas do desenvolvimento tumoral, uma vez que é uma neoplasia espontânea e biologicamente semelhante àquelas diagnosticadas em mulheres.

8 CONCLUSÃO

. A partir da caracterização citogenética e imunocitoquímica, bem como das observações realizadas pelos ensaios de formação de esferas, conclui-se que:

- Cultivos de células tumorais provenientes de neoplasias mamárias em cadelas podem ser padronizados *in vitro*, em cultivos de longo prazo, sendo excelentes métodos para o estudo citogenético envolvendo alterações a nível cromossômico, e também, para a análise da expressão de filamentos intermediários *in vitro*;
- Cultivos celulares diferentes apresentam quantidades distintas de populações positivas e negativas quanto à expressão de marcadores comuns de células-tronco cancerosas em câncer de mama;
- Apesar de apresentarem respostas diferentes, todos os cultivos celulares exibiram potencial tumorigênico através da análise *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ACS, IARC, U. **Human Development Index Transitions**. Disponível em: <<http://canceratlas.cancer.org/the-burden/human-development-index-transitions/>>. Acesso em: 24 dez. 2014.
- ADAMSKI, D. MAYOL, J-F; PLATET, N; BERGER, F; HÉRODIN, F; WION, D. Effects of Hoechst 33342 on C2C12 and PC12 cell differentiation. **FEBS letters**, v. 581, n. 16, p. 3076–80, 26 jun. 2007.
- AGUIRRE-GHISO, J. A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 11, p. 834–46, nov. 2007.
- ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2002. p. 907–982
- AL-HAJJ, M. WICHA, M S; BENITO-HERNANDEZ, A; MORRISON, S. J; CLARKE, M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–8, 1 abr. 2003.
- AL-HAJJ, M.; CLARKE, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7274–82, 20 set. 2004.
- ALLEN, A. C. So-Called Mixed Tumors of the Mammary Gland of Dog and Man. With Special Reference to the General Problem of Cartilage and Bone Formation. **Archives Pathology**, v. 29, p. 589–624, 1940.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **U.S. Pet Ownership & Demographics Sourcebook**. USA: 2014
- ANBAZHAGAN, R; BARTEK, J; MONAGHAN, P; GUSTERSON, B A. Growth and development of the human infant breast. **The American journal of anatomy**, v. 192, n. 4, p. 407–17, dez. 1991.
- ANISIMOV, V. N.; UKRAINTSEVA, S. V; YASHIN, A. I. Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 807–19, out. 2005.
- ANTINOFF, N.; HAHN, K. Ferret oncology: diseases, diagnostics, and therapeutics. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 7, n. 3, p. 579–625, 2004.
- ARPINO, G. BARDOU, V J; CLARK, G M; ELLEDGE, R M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast cancer research : BCR**, v. 6, n. 3, p. R149–56, jan. 2004.
- ART, J. M. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. **Veterinary Pathology Online**. v. 212, p. 200–212, 2005.
- BECK, B.; BLANPAIN, C. Unravelling cancer stem cell potential. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 10, p. 727–38, out. 2013.

BEHBOD, F. et al. Transcriptional profiling of mammary gland side population cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 4, p. 1065–74, abr. 2006.

BERNAL, S. D.; STAHEL, R. A.; BAYLIN, S. B. Cytoskeleton-associated proteins: their role as cellular integrators in the neoplastic process. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 3, n. 3, p. 191–204, jan. 1985.

BLACKING, T. M.; WATERFALL, M.; ARGYLE, D. J. CD44 is associated with proliferation, rather than a specific cancer stem cell population, in cultured canine cancer cells. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 141, n. 1-2, p. 46–57, 15 maio 2011.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, 1997.

BROERS, J. L. V.; ROT, M. K.; OOSTENDORP, T.; BEPLER, G.; LEIJE, L.; CARNEY, D. N.; VOOIJIS, P.; RAMAERKES, F. C. S. Spontaneous change in intermediate filament proteins expression patterns in lung cancer cell. **Journal of Cell Science**, v. 91, p. 91–108, 1988.

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

CHARAFE-JAUFFRET, E. L.; GINESTIER, C.; IOVINO, F.; WICINSKI, J.; CERVERA, N.; FINETTI, P.; HUR, M.; DIEBEL, M.; MONVILLE, F.; DUTCHER, J.; BROWN, M.; VIENS, P.; XERRI, L.; BERTUCCI, F.; STASSI, G.; DONTU, G.; BIRNBAUM, D.; WICHA, M. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. **Cancer research**, v. 69, n. 4, p. 1302–13, 15 fev. 2009.

CHUTE, J. P.; MURAMOTO, G.; WHITESIDES, J.; COLVIN, M.; SAFI, R.; CHAO, N. J.; MCDONNELL, D. P. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p. 11707–12, 1 ago. 2006.

CLARKE, M. F.; DICK, J. E.; DIRKS, P. B.; EAVES, C. J.; JAMIESON, C. H. M.; JONES, D. L.; VISVADER, J.; WEISSMAN, I. L.; WAHL, G. M. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer research**, v. 66, n. 19, p. 9339–44, 1 out. 2006.

CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2537–42, jun. 2009.

COCOLA, C.; ANASTASI, P.; ASTIGIANO, S.; PISCITELLI, E.; PELUCCHI, P.; VILARDO, L.; BERTOLI, G.; BECCAGLIA, M.; VERONESI, M. C.; SANZONE, S.; BARBIERI, O.; REINBOLD, R.; LUVONI, G. C.; ZUCCHI, I. Isolation of canine mammary cells with stem cell properties and tumour-initiating potential.

Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, v. 44, p. 214–7, jul. 2009. Supplement 2.

COLLINS, A. T.; BERRY, P.; 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, 1 dez. 2005.

DANAEI, G. VANDER HOORN, S; LOPEZ, A D; MURRAY, C J L; EZZATI, M. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784–93, 19 nov. 2005.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4793–807, 15 dez. 2008.

DIXON, J.; ANDERSON, T.; PAGE, D. Infiltrating lobular carcinoma of the breast. **Cancer**, v. 77, n. 1, p. 113–120, 1996.

DONNENBERG, V. S.; DONNENBERG, A. D. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 45, n. 8, p. 872–7, ago. 2005.

DONTU, G.; ABDALLAH, W M; FOLEY, J M; JACKSON, K W; CLARKE, M F; KAWAMURA, M J; WICHA, M S. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. **Cancer Research**. p. 1253–1270, 2003.

DOYLE, L. A. DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 26, p. 15665–15670, 22 dez. 1998.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21–33, jan. 2006.

FERLETTA, M.; GRAWÉ, J.; HELLMÉN, E. Canine mammary tumors contain cancer stem-like cells and form spheroids with an embryonic stem cell signature. **The International journal of developmental biology**, v. 55, n. 7-9, p. 791–9, jan. 2011.

FILHO, J. C. O. YUNES, R. Estudo retrospectivo de 1 . 647 tumores mamários em cães. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 177–185, 2010.

FILLMORE, C. M.; KUPERWASSER, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 2, p. R25, jan. 2008.

FONSECA, C. S. **Avaliação dos níveis séricos de 17, b-estradiol e progesterona em cadelas portadoras de neoplasias mamárias**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, 1999.

FRANCO, J. M. "Mastologia: formação do especialista." In: **Mastologia: formação do especialista**. São Paulo: Atheneu. p. 167–170. 1997.

FRESE, K. K.; TUVESON, D. A. Maximizing mouse cancer models. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 9, p. 645–58, set. 2007.

FRIEDLANDER, M. L.; HEDLEY, D. W.; TAYLOR, I. A. N. W. Review article Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. p. 961–974, 2006.

GAMA, A; ALVES, A; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 453, n. 2, p. 123–32, ago. 2008.

GÄRTNER, F. GERALDES, M; CASSALI, G; REMA, A; SCHMITT, F. DNA measurement and immunohistochemical characterization of epithelial and mesenchymal cells in canine mixed mammary tumours: putative evidence for a common histogenesis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 158, n. 1, p. 39–47, jul. 1999.

GINESTIER, C. HUR, M; CHARAFE-JAUFFRET, E; MONVILLE, F; DUTCHER, J; BROWN, M; JACQUEMIER, J; VIENS, P; KLEER, C; LIU, S; SCHOTT, A; HAYES, D; BIRNBAUM, D; WICHA, M; DONTU, G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell stem cell**, v. 1, n. 5, p. 555–67, nov. 2007.

GINESTIER, C.; CHARAFE-JAUFFRET, E; MONVILLE, F; DUTCHER, J; BROWN, M; JACQUEMIER, J; VIENS, P; KLEER, C; LIU, S; SCHOTT, A; HAYES, D; BIRNBAUM, D; WICHA, M; DONTU, G. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. **Cell Cycle**, v. 8, n. 20, p. 3297–3302, 27 out. 2009.

GLOBOCAN. **Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Lyon: [s.n.]. 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>.

GOLDSCHMIDT, M. PEÑA, L; RASOTTO, R; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–31, jan. 2011.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual Review Medicine**, v. 53, p. 615–27, 2002.

GOULD, V. E. KOUKOULIS, G K. Coexpression Patterns of Vimentin and Glial Filament Protein with Cytokeratins in the Normal, hyperplastic and Neoplastic Breast. **American Journal of Pathology**. v. 137, n. 5, p. 1143–1155, 1990.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306–13, 19 jan. 2012.

GRIMWADE, B. D. et al. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. **Blood**. p. 2322–2334, 2015.

GUELSTEIN, V. I.; TCHYPYSHEVA, T. A.; ERMILOVA, V. D.; LITVINOVA, L. V.; TROYANOVSKY, S. M.; BANNIKOV, G. A. Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 42, n. 2, p. 147–153, 15 ago. 1988.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–95, 17 nov. 2006.

GUPTA, K.; SOOD, N.; UPPAL, S. Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies. **International Organization of Scientific Research Journals**. v. 2, n. 2, p. 322–333, 2012.

GUPTA, P. B.; CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells: mirage or reality? **Nature medicine**, v. 15, n. 9, p. 1010–2, set. 2009.

GUSTERSON, B. A. WARBURTON, M J; MITCHELL, D; ELLISON, M; NEVILLE, A; PHILIP, S. Distribution of Myoepithelial Cells and Basement Membrane Proteins in the Normal Breast and in Benign and Malignant Breast Diseases. p. **Cancer Research**. 4763–4770, 1982.

HAHN, K. A. RICHARDSON, R. C.; HAHN, E. ; CHRISMAN, C. L. Diagnostic and Prognostic Importance of Chromosomal Aberrations Identified in 61 Dogs with Lymphosarcoma. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 5, p. 528–540, 1 set. 1994.

HATAKA, A. **Citologia aspirativa com agulha fina e histopatologia: valor e significado para o diagnóstico e prognóstico do câncer de mama em cadelas**. [s.l.]. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2004.

HELLMÉN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. S1, p. 90, 14 jul. 2005.

HERMANN, P. C. HUBER, S L; HERRLER, T; AICHER, A; ELLWART, J W; GUBA, M; BRUNS, C J; HEESCHEN, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. **Cell stem cell**, v. 1, n. 3, p. 313–23, 13 set. 2007.

HERSHEY, A.; DUBIELZIG, R. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 811, p. 805–811, 2005.

HODGSON, J. G. EDEN, A; JACKSON-GRUSBY, L; DAUSMAN, J; GRAY, J W; LEONHARDT, H; JAENISCH, R. Induction of Tumors in Mice by Genomic Hypomethylation. v. 300, n. April, p. 489–492, 2003.

HÖRSTING, N. et al. Cytogenetic analysis of three oropharyngeal malignant melanomas in dogs. **Research in Veterinary Science**. n. 1971, p. 147–149, 1999.

HUNTLY, B. J. P.; GILLILAND, D. G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. **Nature Reviews Cancer**. v. 5, n. April, 2005.

HURVITZ, S. A.; FINN, R. S. What's positive about "triple-negative" breast cancer? **Future Oncology**, v. 5, n. 7, p. 1015–1025, 1 set. 2009.

HWANG-VERSLUES, W. W. et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. **PloS one**, v. 4, n. 12, p. e8377, jan. 2009.

INCA. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2014.

JIANG, F. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. **Molecular cancer research : MCR**, v. 7, n. 3, p. 330–8, mar. 2009.

JIANG, L. HE, D; YANG, D; CHEN, Z; PAN, Q; MAO, A; CAI, Y; LI, X; XING, H; SHI, M; CHEN, Y; BRUCE, I; WANG, T; JIN, L; QI, X; HUA, D; JIN, J; MA, X. MiR-489 regulates chemoresistance in breast cancer via epithelial mesenchymal transition pathway. **FEBS Letters**, v. 588, n. 11, p. 2009–2015, 2015.

JONES, P. A; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683–92, 23 fev. 2007.

KAJIYAMA, H. SHIBATA, K; TERAUCHI, M; YAMASHITA, M; INO, K; NAWA, A; KIKKAWA, F. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 277–283, 2007.

KAKARALA, M.; WICHA, M. S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **Journal of clinical oncology** : official journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 26, n. 17, p. 2813–20, 10 jun. 2008.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of comparative pathology**, v. 133, n. 4, p. 246–52, nov. 2005.

KHANNA, C. et al. How to stay out of a BIND To the editor : **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1065–1066, 2006.

KIMURA, K. C.; ZANINI, D; NISHIYA, A. T.; DAGLI, M L Z. Domestic animals as sentinels for environmental carcinogenic agents. **BMC proceedings**, v. 7, n. Suppl 2, p. K13, jan. 2013.

KING, M.; MARKS, J.; MANDELL, J. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 302, n. OCTOBER, p. 643–647, 2003.

KLEIN, W. R. BRAS, GE; MISDORP, W. Equine sarcoid: BCG immunotherapy compared to cryosurgery in a prospective randomised clinical trial. **Cancer Immunology Immunotherapy**. (21) p. 133–140, 1986.

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, n. 1, p. 618, jan. 2010.

KORHONEN, T. KUUKASJÄRVI, T; HUHTALA, H; ALARMO, E L; HOLLI, K; KALLIONIEMI, A; PYLKKÄNEN, L. The impact of lobular and ductal breast cancer histology on the metastatic behavior and long term survival of breast cancer patients. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 22, n. 6, p. 1119–24, dez. 2013.

KUMAR, V. **Bases Patológicas das Doenças**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2011.

LEE, C. KIM, W; LIM, J; KANG, M; KIM, D; KWEON, O. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. v. 5, p. 63–64, 2004.

LEELAWAT, K. KEERATICHAMROEN, S; LEELAWAT, S; TOHTONG, R. CD24 induces the invasion of cholangiocarcinoma cells by upregulating CXCR4 and increasing the phosphorylation of ERK1/2. **Oncology letters**, v. 6, n. 5, p. 1439–1446, nov. 2013.

LI, C. I. ANDERSON, B O; DALING, J R; MOE, R E. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **JAMA**, v. 289, p. 1421 – 1424, 2003.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British journal of cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046–52, 31 out. 2005.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 605–31, jan. 2005.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803–19, 8 dez. 2005.

LINGAAS, F. COMSTOCK, K E; KIRKNESS, E F; SORENSEN, A; AARSKAUG, T; HITTE, C; NICKERSON, ML; MOE, L; SCHMIDT, L S; THOMAS, R; BREEN, M; GALIBERT, F; ZBAR, B; OSTRANDER, E. A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. **Human molecular genetics**, v. 12, n. 23, p. 3043–53, 1 dez. 2003.

LORD, S. J. BERNSTEIN, L; JOHNSON, K; MALONE, K E; MCDONALD, J; MARCHBANKS, P; SIMON, M S; STROM, B; PRESS, MF; FOLGER, S G; BURKMAN, R T; DEAPEN, D; SPIRTAS, R; URSIN, G. Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding: a case-control study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**. v. 17, n. 7, p. 1723–30, jul. 2008.

MALAISE, E. P.; CHAUAUDRA, N.; TUBIANA, M. The relationship between growth rate, labelling index and histological type of human solid tumours. **European Journal of Cancer**, v. 9, n. 4, p. 305–312, abr. 1973.

MARCATO, P. DEAN, C; GIACOMANTONIO, C; LEE, PW.K.. Aldehyde dehydrogenase: Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1378–1384, 4 nov. 2011.

MAYR, B. ESCHBORN, U.; LOUPAL, G; SCHLEGER, W. Characterisation of complex karyotype changes in two canine bone tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 51, p. 341–343, 1991a.

MAYR, B. GILLI, H.; SCHLEGER, W.; REIFINGER, M.; BURTSCHER, H. CYTOGENETIC Characterization of Mammary Tumors in Two Domestic Dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 38, n. 1-10, p. 141–147, 12 fev. 1991b.

MAYR, B. BREEDING, A; REIFINGER, M; CK, H L. Cytogenetic analyses of four solid tumours in dogs. **Research in Veterinary Science**. p. 88–95, 1994.

MAYR, B.; SCHLEGER, W.; LOUPALT, G. Cytogenetic Studies in a Canine Melanoma. **Journal of Comparative Pathology**. v. 106, 1992.

MERLO, D. F. ROSSI, L; PELLEGRINO, C; CEPPI, M; CARDELLINO, U; CAPURRO, C; RATTO, A; SAMBUCCO, P L; SESTITO, V; TANARA, G; BOCCHINI, VL. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumour Registry of Genoa, Italy. p. 976–984, 2008.

MICHISHITA, M. AKIYOSHI, R; YOSHIMURA, H; KATSUMOTO, T; ICHIKAWA, H; OHKUSU-SUKADA, K; NAKAGAWA, T; SASAKI, N; TAKAHASHI, K. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 2, p. 254–60, out. 2011.

MICHISHITA, M. AKIYOSHI, R; SUEMIZU, H; NAKAGAWA, T; SASAKI, N; TAKEMITSU, H; ARAI, T; TAKAHASHI, K. Aldehyde dehydrogenase activity in cancer stem cells from canine mammary carcinoma cell lines. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 193, n. 2, p. 508–13, ago. 2012.

MILL, Y. FERN, V; RAM, S; MART, J; MULAS, DE; ORD, J. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. p. 363–367, 2003.

MISDORP, W. ELSE, R W; HELLMEIN, E; LIPSCOMB, TP. **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat**. Washington, DC: [s.n.]. 1999.

MOULTON, J. E. Tumors in domestic animals. In: [s.l.] Berkeley: University of California, 1990. p. 518–522.

MULLIGAN, R. M. Mammary cancer in the dog: a study of 120 cases. **American journal of veterinary research**, v. 36, n. 9, p. 1391–6, 1 out. 1975.

NICHOLAS, F. W. **Introdução à Genética Veterinária**. 3 ed. [S.l.] Artmed, 2012. p. 347

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

O'BRIEN, C. A.; POLLETT, A; GALLINGER, S; DICK, J E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 106–10, 4 jan. 2007.

O'HARE, M. J. ORMEROD, M G.; MONAGHAN, P; LANE, E. B; GUSTERSON, B A.. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. **Differentiation**, v. 46, n. 3, p. 209–221, abr. 1991.

ONDER, T. T. GUPTA, P B; MANI, S; YANG, J; LANDER, E S; WEINBERG, R. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer research**, v. 68, n. 10, p. 3645–54, 15 maio 2008.

OSIN, P. P. ANBAZHAGAN, R; BARTKOVA, J; NATHAN, B; GUSTERSON, B. Breast development gives insights into breast disease. **Histopathology**, v. 33, n. 3, p. 275–283, set. 1998.

PALMER, T. E.; MONLUX, A. W. Acid Mucopolysaccharides in Mammary Tumors of Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 5, p. 493–509, 1 set. 1979.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 2946, n. 2000, p. 2943–2946, 2008.

PATRAWALA, L. CALHOUN, T; Side Population Is Enriched in Tumorigenic , Stem-Like Cancer Cells , whereas ABCG2 + and ABCG2 Å Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic. **Cancer Research**. n. 14, p. 6207–6220, 2005.

PONTI, D. COSTA, A; ZAFFARONI, N; PRATESI, G; PETRANGOLINI, G; CORADINI, D; PILOTTI, S; PIEROTTI, M; 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, 1 jul. 2005.

PRASMICKAITE, L. ENGESAETER, B; SKRBO, N; HELLENES, T; KRISTIAN, A; OLIVER, N K; SUO, Z; MAELANDSMO, G M. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity does not select for cells with enhanced aggressive properties in malignant melanoma. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10731, jan. 2010.

RAKHA, E. A EL-SAYED, M E; POWE, D G; GREEN, A R; HABASHY, H; GRAINGE, M J; ROBERTSON, J F R; BLAMEY, R; GEE, J; NICHOLSON, R I; LEE, A H S; ELLIS, I O. Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 44, n. 1, p. 73–83, jan. 2008.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R. Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 952–959, 2003.

RASHEED, Z. A YANG, J; WANG, Q; KOWALSKI, J; FREED, I; MURTER, C; HONG, S; KOORSTRA, J; RAJESHKUMAR, N V; HE, X; GOGGINS, MI; IACOBUZIO-DONAHUE, C; BERMAN, D; LAHERU, D; JIMENO, A; HIDALGO, M; MAITRA, A; MATSUI, W. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 5, p. 340–51, 3 mar. 2010.

REID, B. J. LI, XI; GALIPEAU, P C; VAUGHAN, T L. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 87–101, fev. 2010.

REIMANN, N. et al. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). **Chromosome Research**. v. 4, p. 306–309, 1996.

REIMANN, N. BOSMA, A A; LONG, S; BARTNITZKE, S; FISCHER, P. Working with Canine Chromosomes : Current Recommendations for Karyotype Description. **The Journal of Heredity**. p. 31–34, 1999.

REYA, T. MORRISON, S J; CLARKE, MF; WEISSMAN, I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. November, p. 105–111, 2001.

RONINSON, I. B. ABELSON, H T; HOUSMAN, D E; HOWELL, N; VARSHAVSKY, A. Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 626–628, 14 jun. 1984.

RUTTEMAN, G. R. CORNELISSE, C J; DIJKSHOORN, N J; POORTMAN, J; MISDORP, W. Flow Cytometric Analysis of DNA Ploidy in Canine Mammary Tumors1. **Cancer Research**. 1988.

SARRIÓ, D. RODRIGUEZ-PINILLA, S M; HARDISSON, D; CANO, A; MORENO-BUENO, G; PALACIOS, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer research**, v. 68, n. 4, p. 989–97, 15 fev. 2008.

SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1075–9, 29 jun. 2006.

SCHALIE, W. H. VAN DER JR, H S G; BANTLE, J A; ROSA, CT DE; FINCH, R A; JOHN, S; REUTER, H; BACKER, L C; BURGER, J; FOLMAR, L C; STOKES, W S. Animals as Sentinels of Human Health Hazards of Environmental Chemicals. v. 107, n. 4, p. 309–315, 1999.

SCHNEIDER, R.; DORN, C. R.; TAYLOR, D. O. N. Factors Influencing Canine Mammary Cancer Development and Postsurgical Survival. **Journal National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1249–1261, 1 dez. 1969.

SELTENHAMMER, M. H. et al. Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma. **Pigment cell research**, v. 17, n. 6, p. 674–81, dez. 2004.

SHACKLETON, M. VAILLANT, F; SIMPSON, K J; STINGL, J; SMYTH, G K; ASSELIN-LABAT, M; WU, L; LINDEMAN, G J; VISVADER, J E. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature**, v. 439, n. 7072, p. 84–8, 5 jan. 2006.

SHEN, C. XIANG, M; NIE, C; HU, H; MA, Y; WU, H. CD44 as a molecular marker to screen cancer stem cells in hypopharyngeal cancer. **Acta oto-laryngologica**, v. 133, n. 11, p. 1219–26, nov. 2013.

SHMELKOV, S. V. BUTLER, J M; HOOPER, A T; HORMIGO, A; KUSHNER, J; MILDE, T; CLAIR, R S; BALJEVIC, M; WHITE, I; JIN, D K; CHADBURN, A; MURPHY, A J; VALENZUELA, D M; GALE, NICHOLAS W; THURSTON, G; YANCOPOULOS, G D; ANGELICA, M D; KEMENY, N; LYDEN, D; RAFII. CD133 expression is not restricted to metastatic colon cancer cells initiate tumors. **Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n. 6, p. 2111–2120, 2008.

SIMS-MOURTADA, J. IZZO, J G; AJANI, J; CHAO, K S C. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. **Oncogene**, v. 26, n. 38, p. 5674–9, 16 ago. 2007.

SINGH, S. K. CLARKE, I D; TERASAKI, M; BONN, V E; HAWKINS, C; SQUIRE, J; DIRKS, P. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. **Cancer Research** p. 5821–5828, 2003.

SMALLEY, M. J.; CLARKE, R. B. The mammary gland “side population”: a putative stem/progenitor cell marker? **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 10, n. 1, p. 37–47, jan. 2005.

SMITH, B. N. BURTON, L J; HENDERSON, V; RANDLE, D D; MORTON, D J; SMITH, B; TALIAFERRO-SMITH, L; NAGAPPAN, P; YATES, C; ZAYZAFOON, M; CHUNG, L W K; ODERO-MARAH, V. Snail promotes epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells in part via activation of nuclear ERK2. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104987, jan. 2014.

SORENMO, K. U. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of Spaying and Timing of Spaying on Survival of Dogs with Mammary Carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 266, 2000.

SUETSUGU, A. NAGAKI, M; AOKI, H; MOTOHASHI, T; KUNISADA, T; MORIWAKI, H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 351, n. 4, p. 820–4, 29 dez. 2006.

SUTTER, N. B.; OSTRANDER, E. A. Dog star rising: the canine genetic system. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 12, p. 900–10, dez. 2004.

TATEYAMA, S.; COTCHIN, E. Electron microscopic observations on canine mixed mammary tumors, with special reference to cytoplasmic filamentous components. **American journal of veterinary research**, v. 39, n. 9, p. 1494–501, 1 out. 1978.

TAYLOR, P. J.; LANE, E. B. Keratin expression in the mammary gland. In: **The Mammary Gland: Development, Regulation and Function**. New York: [s.n.]. p. 181.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 4 out. 2012.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442–54, jun. 2002.

TROPEPE, V. et al. Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye. **Science**. v. 287, n. 5460, p. 2032–2036, 2000.

TWENTYMAN, P. R.; FOX, N. E.; BLEEHEN, N. M. Drug resistance in human lung cancer cell lines: Cross-resistance studies and effects of the calcium transport blocker, verapamil. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**, v. 12, n. 8, p. 1355–1358, ago. 1986.

UVA, P. et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC genomics**, v. 10, p. 135, jan. 2009.

VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and molecular life sciences** : CMLS, v. 65, n. 23, p. 3756–88, nov. 2008.

VISVADER, J. E.; LINDEMAN, G. J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 10, p. 755–68, out. 2008.

WALSH, T.; KING, M.-C. Ten genes for inherited breast cancer. **Cancer cell**, v. 11, n. 2, p. 103–5, fev. 2007.

WANG, J. C. Y. Good cells gone bad: the cellular origins of cancer. **Trends in molecular medicine**, v. 16, n. 3, p. 145–51, mar. 2010.

WANG, R. LV, Q; MENG, W; TAN, Q; ZHANG, S; MO, X; YANG, X. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. **Journal of thoracic disease**, n. 6, p. 829–37, jun. 2014.

WELLNER, U. SCHUBERT, J; BURK, U C; SCHMALHOFER, O; ZHU, F; SONNTAG, A; WALDVOGEL, B; VANNIER, C; DARLING, D; ZUR HAUSEN, A; BRUNTON, V G; MORTON, J; SANSOM, O; SCHÜLER, J; STEMLER, M P; HERZBERGER, C; HOPT, U; KECK, T; BRABLETZ, S; BRABLETZ, T. The EMT-

activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. **Nature cell biology**, v. 11, n. 12, p. 1487–95, dez. 2009.

YU, F. YAO, H; ZHU, P; ZHANG, X; PAN, Q; GONG, C; HUANG, Y; HU, X; SU, F; LIEBERMAN, J; SONG, E. Let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1109–23, 14 dez. 2007.

ZATLOUKAL, J.; KOHOUT, P.; REPUBLIC, C. Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. **Acta Veterinaria Bruno**. v. 74. p. 103–109, 2005.

ZHANG, J.; MA, L. MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3-4, p. 653–662, 2012.