



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

VANESSA JASCKSTET

**Marcadores prognósticos em tumores mamários de
cadelas – revisão de literatura**

Brasília – DF

2013

VANESSA JASCKSTET

**Marcadores prognósticos em tumores mamários de
cadelas – revisão de literatura**

Monografia apresentada para a conclusão
do Curso de Medicina Veterinária da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina
Mortari

Brasília – DF

2013

Jasckstet, Vanessa.

Marcadores prognósticos em tumores mamários de cadelas – revisão de literatura / Vanessa Jasckstet; orientação de Dra. Ana Carolina Mortari – Brasília, 2013. 32p.

Monografia de Graduação – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Neoplasias mamárias. 2. Marcadores tumorais. 3. Células iniciadoras de tumor.

I. Mortari, Ana Carolina. II. Marcadores prognósticos em tumores mamários de cadelas – revisão de literatura.

Nome do Autor: Vanessa Jasckstet

Título da Monografia de conclusão de Curso: Marcadores prognósticos em tumores mamários de cadelas – revisão de literatura.

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação, e nenhuma parte desta monografia de graduação pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

Vanessa Jasckstet

JASCKSTET, V. Marcadores prognósticos em tumores mamários de cadelas – revisão de literatura. 2013. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

Este estudo tem como objetivo revisar os principais marcadores tumorais utilizados como fatores preditivos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. O tumor de mama em cadelas é uma neoplasia comum na rotina dos pequenos animais e possui diversas características semelhantes ao câncer de mama em mulheres, servindo como modelo de estudo para esta neoplasia. A descoberta das células iniciadoras de tumor é um aspecto chave para o entendimento da carcinogênese tumoral e o desenvolvimento de novas terapias específicas para cada paciente.

Palavras-chave: neoplasias mamárias, marcadores tumorais, células iniciadoras de tumor

JASCKSTET, V. Prognostic markers in mammary tumors of female dogs - review. 2013. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

ABSTRACT

This study aims to review the main tumor markers used as predictive and prognostic factors in canine mammary neoplasias. Mammary gland tumors are commonly diagnosed in small animals and have many similar characteristics to breast cancer in women, serving as an animal model to study this neoplasm. The discovery of tumor-initiating cells is a key to understand carcinogenesis and the development of patient-specific therapies.

Key words: mammary neoplasias, tumor markers, tumor-initiating cells

LISTA DE TABELAS

PARTE I

Tabela 1 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.....	10
Tabela 2 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Dr. Antonio Clemenceau.....	11
Tabela 3 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu.....	13

PARTE II

Tabela 4 – Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas.....	17
--	----

LISTA DE FIGURAS

PARTE II

Figura 1 – Adenocarcinoma simples, expressão de ER, método imuno-histoquímico (100x).....	20
Figura 2 – Adenocarcinoma simples, expressão de COX-2, método imuno-histoquímico (100x).....	22
Figura 3 – Adenocarcinoma simples, expressão de p53, método imuno-histoquímico (40x).....	23
Figura 4 – Imuno-marcação para PCNA em um caso de carcinoma inflamatório mamário.....	25
Figura 5 – Imuno-marcação para Ki-67 em um caso de carcinoma inflamatório mamário.....	26

SUMÁRIO

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.....	09
3	HOSPITAL VETERINÁRIO DR. ANTÔNIO CLEMENCEAU.....	10
4	HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNESP CAMPUS DE BOTUCATU.....	12
5	CONCLUSÃO.....	13

PARTE II – MARCADORES PROGNÓSTICOS EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS – REVISÃO DE LITERATURA

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	NEOPLASIAS MAMÁRIAS.....	15
2.2	RECEPTORES HORMONAIS.....	18
2.3	CICLOXIGENASE-2 (COX-2).....	20
2.4	GENES SUPRESSORES DE TUMOR (p53, BRCA1 e BRCA2).....	22
2.5	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	24
2.6	CÉLULAS INICIADORAS DE TUMOR (CITs).....	26
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

1 INTRODUÇÃO

O estágio supervisionado é uma atividade curricular obrigatória realizada no décimo semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Consiste na realização de atividades nas áreas escolhidas pelo aluno, proporcionando a integração entre teoria e prática, o contato com o mercado de trabalho e o aprimoramento dos conhecimentos adquiridos durante a graduação. O aluno deve cumprir um total de 420 horas durante o estágio de acordo com as áreas de seu interesse.

O estágio foi realizado em três hospitais veterinários: Hospital Veterinário de Animais de Companhia da Universidade de Brasília, Hospital Veterinário Dr. Antônio Clemenceau e Hospital Veterinário da UNESP Campus de Botucatu.

Este relatório tem como objetivo descrever as principais atividades realizadas durante o estágio supervisionado e a casuística acompanhada.

2 HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

O Hospital Veterinário da Universidade de Brasília (UnB) se encontra na Avenida L4 Norte, em Brasília, Distrito Federal. O Hospital atende animais de segunda a sexta-feira das 8h às 18h, tanto consultas novas como retornos. Outros serviços disponibilizados pelo Hospital incluem a Patologia clínica, Patologia Veterinária, Clínica e Cirurgia de Animais Silvestres, Parasitologia.

As consultas são distribuídas em duas grandes áreas: Clínica Médica e Clínica Cirúrgica, de acordo com os sinais apresentados pelo paciente no momento da triagem, que é feita pela manhã, a partir das 07h30min. O serviço de atendimento é realizado pelos residentes respectivos de cada área, além dos veterinários contratados e estagiários técnicos e curriculares. Por se tratar de um hospital-escola os residentes têm ainda a supervisão dos professores responsáveis.

O estágio foi realizado no período de 01 a 31 de agosto de 2012, totalizando 160 horas. Durante o estágio, pôde-se acompanhar a rotina da Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, podendo participar tanto das consultas como dos procedimentos cirúrgicos. A estagiária chegava ao hospital às 8h e tinha a permissão para iniciar a consulta antes que o residente assumisse. Ela fazia a anamnese completa e exame físico do animal. Depois de passadas as informações ao residente, caso fossem necessários outros procedimentos como coleta de sangue, limpeza de ferida, curativos, a estagiária também tinha permissão para executá-los, assim como a realização de radiografias ajudando na contenção do animal. O residente era responsável pelo diagnóstico final do paciente e a estagiária podia auxiliar na elaboração das receitas e explicação ao proprietário. Durante os procedimentos cirúrgicos a estagiária tinha permissão para auxiliar as cirurgias, fazer suturas e procedimentos mais simples como as castrações.

A casuística acompanhada durante o estágio encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Veterinário da UnB

Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos	Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos
Ortopedia e Neurologia	Fratura de tíbia	1	Sistema Genito/Urinário	Piometra	3
	Fratura de úmero	1		Cesariana	2
	Fratura de fêmur	2		Cálculo vesical	2
	Luxação patelar	3	Sistema Digestório	Cálculo uretral	1
	Luxação coxo-femoral	1		Intussuscepção	1
	Displasia coxo-femoral	3		Corpo estranho	2
Hérnia de disco	3	Megacólon		1	
Outros	Feridas	4	Oncologia	Tratamento periodontal	2
	Politraumatismo	2		Tumor de mama	7
	Hérnia perineal	2		Lipoma	1
	Flegmão	1		Neoplasias a esclarecer	4
	Abscesso	1		Carcinoma de células escamosas	2
	Miíase	2		Tumor na tireoide	1
	Cisto branquial	1			
	Descolamento de retina	1			

3 HOSPITAL VETERINÁRIO DR. ANTÔNIO CLEMENCEAU

O Hospital Veterinário Dr. Antônio Clemenceau é um hospital particular e localiza-se próximo ao setor hípico de Brasília. Atende animais de companhia em regime de plantão, portanto 24h por dia e todos os dias da semana. Os serviços disponibilizados pelo hospital incluem Clínica Médica e Clínica Cirúrgica, além de

especialidades como Ortopedia/Neurologia, Dermatologia, Oncologia, Oftalmologia e Fisioterapia.

Durante o estágio foram acompanhados os serviços de Ortopedia/Neurologia e Oncologia, no período de 1 a 31 de outubro de 2012, totalizando 160 horas. A rotina era um pouco diferente da que foi vista no Hospital da UnB, já que as consultas ou retornos eram previamente marcados, por não se tratar de um hospital-escola, não havendo o sistema de triagem. Por esse mesmo motivo, a estagiária não tinha permissão para iniciar a consulta, mas podia acompanhá-la e podia também auxiliar os procedimentos cirúrgicos.

No serviço de Ortopedia/Neurologia a estagiária podia acompanhar as consultas desde a anamnese, o exame físico específico e os demais procedimentos realizados. Se autorizado pelo veterinário podia realizar coleta de sangue, exame ortopédico e demais atividades. Durante as cirurgias tinha permissão para auxiliá-las e o veterinário sempre deixava claro tudo o que ele fazia e tirava as dúvidas.

No serviço de Oncologia, a estagiária também acompanhava as consultas e foi uma experiência muito importante para o contato com os proprietários, já que o câncer geralmente é um assunto mais delicado a se discutir. A estagiária também participava das cirurgias oncológicas, principalmente relacionadas com biópsias excisionais e mastectomias. Também podia participar e auxiliar nas quimioterapias realizadas, observando as doses dos quimioterápicos, a montagem dos circuitos e os fármacos prescritos para controlar os efeitos colaterais. A casuística acompanhada durante o estágio encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Dr. Antonio Clemenceau

Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos	Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos	
Ortopedia e Neurologia	Fratura de rádio/ulna	2	Oncologia	Mastocitoma	8	
	Fratura de cotovelo	1		Linfoma multicêntrico	7	
	Fratura de metacarpo	1		Linfoma intestinal	1	
	Fratura de pelve	1		Tumor de mama	7	
	Luxação patelar	3		Fibrossarcoma	1	
	Luxação de quadril	1		Carcinoma hepatocelular	1	
	Displasia coxo-femoral	5		Outros	Sialocele	2
	Ruptura do ligamento cruzado cranial	2			Prolongamento de palato e Estenose de narina	1
	Tendinite bicipital	1			Lipidose hepática	3
	Hidrocefalia	4	Corpo estranho		2	
	Convulsão idiopática	1	Prostatectomia		1	
	Hemivértebra	2	Biópsia peniana		1	
	Hérnia de disco	6	Esplenectomia		1	
	Síndrome de Wobbler	1	Piometra		2	
	Meningiomielite por erliquiose	1	Compactação de gl. ad-anal		1	

4 HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNESP CAMPUS DE BOTUCATU

O Hospital Veterinário da UNESP de Botucatu se encontra no Distrito de Rubião Júnior, na cidade de Botucatu, em São Paulo. O Hospital atende animais de pequeno e grande porte, e possui diversos serviços como Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos e Grandes Animais, Patologia Clínica, Radiologia, Zoonoses, Patologia Veterinária, Oftalmologia.

A estagiária acompanhou a área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, que possui um prédio próprio para seu atendimento. O Hospital funciona de 8h às 18h durante a semana e das 8h às 19h nos fins de semana e feriados. Eram atendidas 10 consultas novas por dia, cinco pela manhã e outras cinco na parte da tarde, além dos retornos previamente marcados. O estágio foi realizado no período de 1 a 30 de novembro de 2012, com um total de 160 horas.

A estagiária teve a oportunidade de acompanhar as consultas e retornos atendidos no Hospital, e por se tratar de um hospital-escola tinha permissão para iniciar a consulta e realizar procedimentos complementares como coleta de sangue, limpeza de feridas, realização de talas e bandagens, entre outros. O atendimento era de responsabilidade dos residentes com a supervisão dos professores.

Os procedimentos cirúrgicos eram realizados sempre no período da tarde e a estagiária tinha permissão para auxiliar nos procedimentos e até mesmo realizar procedimentos mais simples como castrações. Após as cirurgias a estagiária deveria descrever o procedimento e esperar a correção do residente responsável; então passava essa descrição para a ficha do animal.

A rotina do hospital era extensa, mas sempre havia a oportunidade de discussão dos casos clínicos e protocolos terapêuticos adotados. Uma vez por semana havia reunião com o professor responsável com realização de seminários ou palestras e discussão dos casos acompanhados durante a semana, além da exposição de dúvidas e sugestões. A casuística acompanhada durante o estágio se encontra na Tabela 3.

Tabela 3 – Casos clínico-cirúrgicos acompanhados no Hospital Veterinário da UNESP Botucatu

Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos	Especialidade	Caso-clínico	Nº de casos
Ortopedia e Neurologia	Fratura de tíbia	1	Sistema Urinário	Uretrostomia com cons.do prepúcio	1
	Fratura de úmero	2		Reurestrostomia	1
	Fratura de dígito	1		Cálculo vesical	1
	Fratura de fêmur	3		Cálculo uretral	1
	Luxação tíbio-társica	2	Sistema Digestório	Impactação fecal	1
	Luxação patelar	2		Tratamento periodontal	1
	Luxação temporo-mandibular	1		Corpo estranho	1
	Displasia coxo-femoral	4	Outros	Ferida por Mordedura	6
	Trauma crânio-encefálico	2		Feridas	3
	Higroma	1		Politraumatismo	3
Hérnia de disco	3	Hérnia perineal		1	
Lesão medular (briga)	1	Hérnia diafragmática		2	
		Hérnia de hiato		1	
Oncologia	Carcinoma de células basais	1	Flegmão	2	
	Mastocitoma	1	Abscesso	2	
	Lipoma	1	Bicho-de-pé	2	
	Neoplasias a esclarecer	2	Miíase	2	
	Carcinoma de células escamosas	2			

5 CONCLUSÃO

O estágio supervisionado foi uma oportunidade muito importante para a fixação dos ensinamentos teóricos e sua integração com a prática, além da vivência da rotina hospitalar e a forma como se relacionar com os proprietários. Foi uma oportunidade também de conhecer novas abordagens terapêuticas e especialidades, bem como o aprimoramento no manejo dos pacientes, procedimentos durante as consultas e técnicas cirúrgicas.

PARTE II – MARCADORES PROGNÓSTICOS EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELAS – REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais comuns em cadelas, e exigem especial atenção, principalmente por servirem de modelo para o estudo do câncer de mama em mulheres. Tumores mamários caninos e humanos compartilham importantes fatores epidemiológicos, clinicopatológicos, bioquímicos e genéticos. Entre estes fatores encontram-se faixa etária de aparecimento, morfologia, efeito protetor da ovariectomia, presença de receptores de estrógeno e progesterona na massa tumoral, órgãos alvo de metástase, evolução clínica e a hereditariedade em alguns casos.

Os tumores mamários constituem cerca de 52% das neoplasias que acometem as fêmeas da espécie canina e aproximadamente 50% dos tumores apresentam características malignas.

A carcinogênese do tumor de mama ainda não é totalmente elucidada, mas sabe-se que estão envolvidos fatores de natureza genética, ambiental e hormonal. A etiologia hormonal no desenvolvimento das neoplasias mamárias é comprovada quando se compara o risco de incidência do tumor de mama em cadelas não castradas e castradas, além da fase em que a intervenção cirúrgica é realizada.

Diversos outros fatores estão relacionados com o desenvolvimento das neoplasias mamárias na fêmea canina. Alguns desses fatores incluem a presença de marcadores moleculares, expressão de receptores como a ciclooxigenase-2 (COX-2), mutações no gene p53, marcadores da taxa de proliferação celular e mais recentemente a identificação de células-tronco cancerígenas ou células-iniciadoras de tumor (CITs) que possuem capacidade de divisão assimétrica, resistência à apoptose e propriedades para exclusão de corantes e quimioterápicos.

A identificação de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite a caracterização do imunofenótipo das células neoplásicas, constituindo fatores prognósticos e preditivos importantes para tornar a escolha do tratamento mais específica e direcionada para cada paciente. Em virtude

da relevância do assunto, o presente trabalho objetivou revisar os principais fatores prognósticos e preditivos em tumores mamários de cadelas, com atenção especial às células-tronco cancerígenas ou células-iniciadoras de tumor (CITs).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias Mamárias

As neoplasias mamárias caninas em cadelas constituem cerca de 52% de todas as neoplasias e aproximadamente 50% dos tumores mamários apresentam caráter maligno (FELICIANO et al., 2012). Essas neoplasias são detectadas em animais de meia idade, entre 9 e 11 anos, com maior chance de desenvolvimento a partir dos 6 anos de idade (PEREZ-ALENZA et al., 2000; SORENMO et al., 2011).

Vários aspectos, incluindo fatores hormonais, nutricionais e genéticos têm sido relacionados com o desenvolvimento de tumores mamários (SOENMO et al., 2011). Um forte indicativo do fator hormonal contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias mamárias é a diferente incidência que ela apresenta entre cadelas inteiras e castradas em diferentes tempos (FELICIANO et al., 2012).

As neoplasias mamárias podem se apresentar como nódulos pequenos ou grandes, aderidos ou móveis, únicos ou múltiplos, dependendo do comportamento biológico do tumor (SOENMO et al., 2011). Em alguns casos o tumor pode apresentar ulceração cutânea ou sinais evidentes de inflamação, como é observado no carcinoma inflamatório (QUEIROGA & LOPES, 2002). As glândulas abdominais caudais e inguinais são mais afetadas, provavelmente pela maior quantidade de tecido glandular (CASSALI et al., 2011; SOENMO et al., 2011, FELICIANO et al., 2012).

A avaliação diagnóstica dos pacientes com câncer de mama deve constar de exame físico completo, hemograma e perfil bioquímico sérico, além de radiografias torácicas em busca de metástases pulmonares (SOENMO et al., 2011). Ao exame radiográfico devem-se realizar três projeções radiográficas do tórax: ventrodorsal e laterolaterais direita e esquerda (SOENMO, 2003; FELICIANO et al., 2012). Estudos revelam que o exame de tomografia computadorizada apresenta maior

acurácia na detecção de metástases pulmonares (OTONI et al., 2010; ALEXANDER et al., 2012).

Outra forma para avaliação de metástases nos linfonodos regionais é através do uso da imuno-histoquímica. Em patologia humana é comum utilizar colorações de citoqueratina para detectar micrometástases ocultas em linfonodos regionais considerados não afetados ou suspeitos quando avaliados por colorações de rotina como a hematoxilina-eosina (SORENMO et al., 2011). Em medicina veterinária, foi realizado um experimento com a aplicação de citoqueratina em 119 linfonodos de cães com neoplasias mamárias malignas, nos quais foram encontradas micrometástases em 9,2% dos casos, portanto ainda são necessárias investigações futuras para saber qual a relevância clínica deste achado (MATOS et al., 2006).

O diagnóstico definitivo é baseado no resultado histopatológico após biópsia excisional (QUEIROGA & LOPES, 2002). A citologia é um método seguro apenas para pesquisa de metástases em linfonodos, com alta taxa de especificidade e sensibilidade na detecção das metástases. A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) deve ser executada nos linfonodos regionais de todos os animais com tumores malignos. Caso a punção seja positiva ou revelar alguma alteração, a possibilidade de excisão do linfonodo afetado deve ser considerada (SORENMO, 2003).

O estadiamento do tumor deve ser feito antes do início do tratamento para avaliar a fase de evolução tumoral, bem como as possibilidades de progressão do tumor (FELICIANO et al., 2012). O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TNM estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para tumores mamários caninos (Tabela 4), que inclui tamanho do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (CASSALI et al., 2011; SORENMO et al., 2011). O estadiamento completo fornece informações cruciais sobre o prognóstico, as quais posteriormente são implementadas no plano de tratamento do paciente (SORENMO et al., 2011). A tabela 4 mostra o estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas proposta pela Organização Mundial de Saúde.

Tabela 4 – Estadiamento clínico dos tumores mamários em cadelas

T: tumor primário				
T ₁ : menor que 3 cm de diâmetro				
T ₂ : entre 3 e 5 cm de diâmetro				
T ₃ : maior que 5 cm de diâmetro				
N: linfonodos regionais		Estádios		
N ₀ : sem envolvimento neoplásico		I: T ₁	N ₀	M ₀
N ₁ : com envolvimento neoplásico		II: T ₂	N ₀	M ₀
		III: T ₃	N ₀	M ₀
		IV: Qualquer T	N ₁	M ₀
		V: Qualquer T	Qualquer N	M ₁
M: metástases à distância				
M ₀ : ausência de metástases à distância				
M ₁ : presença de metástases à distância				

Modificado de Owen LN: Classificação dos tumores em animais domésticos, Geneva, 1980, Organização Mundial da Saúde.

GOLDSCHMIDT et al. (2011) propuseram uma nova classificação para os tumores mamários. Essa classificação separa os tumores em oito diferentes grupos. O primeiro grupo inclui as neoplasias epiteliais malignas, como o carcinoma *in situ*, o carcinoma simples e o carcinoma complexo. Os tumores malignos especiais, como o carcinoma de células escamosas e o carcinoma inflamatório fazem parte de outro grupo. Existe ainda o grupo dos sarcomas, como os osteossarcomas, os condrossarcomas e os fibrossarcomas. As neoplasias benignas incluem tumores como o adenoma simples, o fibroadenoma e o adenoma complexo. Os demais tipos histológicos envolvem o carcinossarcoma, as hiperplasias e displasias mamárias e as alterações do mamilo.

As opções de tratamento dependem do estágio em que se encontra o tumor, do tipo histológico e estadiamento clínico. As terapias mais utilizadas incluem a excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou uma combinação desses tratamentos (NOVOSAD, 2003). A remoção cirúrgica completa, com amplas margens de segurança ainda é o tratamento de escolha, exceto para animais com diagnóstico de carcinoma inflamatório ou com a presença de metástases à distância (FELICIANO et al., 2012). A excisão cirúrgica pode ser curativa em cães com o estágio mais brando da doença e nos tumores pequenos, não invasivos e nos

carcinomas bem diferenciados. Cães com tumores grandes e de alto grau, com grande chance de desenvolver metástases podem se beneficiar de terapias adicionais como a quimioterapia (SORENMO, 2003; CASSALI et al., 2011).

A sobrevida dos animais depende de vários fatores prognósticos como idade, tamanho do tumor, comportamento biológico e tipo histológico (SORENMO, 2003). Animais com carcinoma mamário inflamatório têm sobrevida de poucos meses devido ao extenso envolvimento tumoral e à alta incidência de metástases à distância (SORENMO et al., 2011).

Atualmente o estudo dos marcadores se tornou de extrema importância na medida em que permite conhecer o comportamento biológico e evolução clínica das neoplasias de mama em cadelas, à semelhança do que é padronizado em mulheres (CASSALI et al., 2011).

Neste contexto, o reconhecimento de células-tronco no tecido mamário de humanos têm levado à hipótese de que estas células poderiam originar o câncer mamário, e a identificação de uma subpopulação de células altamente tumorigênicas, denominadas células-tronco cancerígenas, reforça essa teoria. Portanto, o estudo da expressão dos genes relacionados à pluripotencialidade torna-se uma ferramenta auxiliar para determinação das características tumorais e planejamento terapêutico (BOIANI et al., 2005; PANG & ARGYLE, 2010).

2.2 Receptores hormonais

A hipótese de que alguns hormônios aumentam a incidência das neoplasias em cadelas foi postulada pela primeira vez por BITTNER et al. (1948) (BOCARDI et al., 2008). A evidência da etiologia hormonal no tumor de mama em cadelas é associada aos índices de risco que, segundo autores, variam entre cadelas castradas e não castradas e depende ainda da fase em que a intervenção cirúrgica é efetuada (FONSECA & DALECK, 2000; BOCARDI et al., 2008). Questionando trabalhos anteriores, BEAUVAIS et al. (2012), em estudo estatístico recente utilizando inúmeras publicações sobre o assunto, afirmam que existem algumas evidências que sugerem que as fêmeas castradas antes de 2,5 anos de idade estão associadas com redução considerável no risco de tumores malignos, e que este risco pode ser ainda mais reduzido quando o procedimento é realizado antes do

primeiro estro; porém os autores consideram esta evidência fraca devido à escassez de estudos publicados com análises estatísticas adequadas, que não levaram em consideração fatores importantes, como por exemplo, o uso de derivados sintéticos de esteróides. Literaturas prévias descreveram que o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias em cadelas castradas antes do primeiro ciclo estral é de 0,05%, após o primeiro estro sobe para 8%, e é de aproximadamente 26% quando a castração ocorre após o segundo estro (SCHINEIDER et al., 1970; FANTON & WITHROW, 1981).

Os receptores hormonais são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). Cerca de 50% a 60% dos tumores malignos nas cadelas contém receptores de estrógeno (ER), mais de 30% contém receptores de progesterona (RP) e cerca de 20% apresentam receptores de andrógeno, o que corrobora com o fato de os tumores mamários serem hormônio-dependentes (RUTTEMAN et al., 1988; GOBELLO & CORRADA, 2001; TODOROVA, 2006). MacEWEN et al. (1982) e RUTTEMAN et al. (1988) observaram que aproximadamente 70% dos tumores benignos apresentam receptores de estrógeno e progesterona, o que pode ser explicado pelo fato de as lesões benignas serem melhor diferenciadas (MacEWEN et al., 1982). A maior expressão de receptores de estrógeno e progesterona está relacionada ao melhor prognóstico tanto dos pacientes caninos como dos seres humanos com carcinomas mamários (HORTA et al., 2012).

Adenocarcinomas mamários simples e complexos de fêmeas caninas expressam mais receptores de estrógeno do que os carcinomas indiferenciados, carcinomas sólidos ou sarcomas (MacEWEN et al., 1982; KOMATSU et al., 2012). Autores encontraram ainda relação entre o tamanho do tumor e a expressão de receptores para progesterona, sendo a imunomarcacão menor nos tumores maiores que cinco centímetros (SILVA et al., 2004).

A expressão dos receptores de estrógeno geralmente é encontrada nos núcleos das células neoplásicas, mas também pode ser vista no citoplasma (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012). A expressão imuno-histoquímica deste receptor é exemplificada na Figura 1.

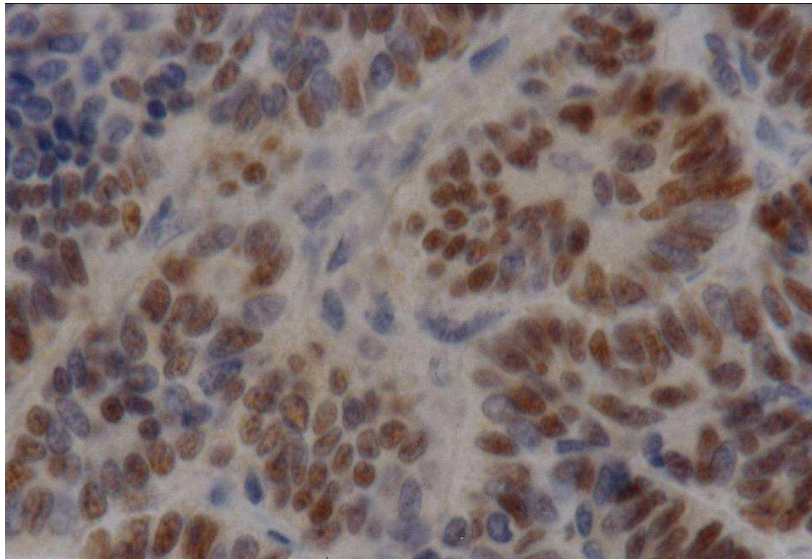


Figura 1 – Adenocarcinoma simples, expressão de ER, método imuno-histoquímico (100x). Fonte: BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012.

A inibição dos receptores de estrógeno por meio da ovário-salpingo-histerectomia ou uso de fármacos anti-estrogênicos como o tamoxifeno, podem influenciar na sobrevivência dos pacientes (HORTA et al., 2012). A terapêutica hormonal é eficaz em cerca de 30% dos casos, se usada de forma aleatória. Por outro lado, cerca de 60% dos pacientes com lesões positivas para receptores hormonais respondem a esta forma terapêutica, enquanto menos de 10% de pacientes com lesões negativas para receptores hormonais respondem ao tratamento (ZUCCARI et al., 2008). DEPES et al. (2003) demonstraram que não há associação entre a positividade de receptores hormonais e a resposta à quimioterapia, mas houve associação com a resposta à terapia hormonal.

2.3 Cicloxigenase-2 (COX-2)

A cicloxigenase é uma classe de enzimas relacionada à formação de mediadores inflamatórios. A expressão dessa enzima em neoplasias está relacionada à progressão tumoral, sendo considerada um fator de prognóstico ruim para vários tipos histológicos (DORÉ, 2011; HORTA et al., 2012). Alguns estudos correlacionam a alta expressão de COX-2 com malignidade, alta capacidade de

proliferação das células neoplásicas, neovascularização e baixa taxa de apoptose, fatores relacionados com o aumento do potencial metastático das células tumorais (CASSALI et al., 2011).

Condições celulares como hipóxia e a expressão de citocinas (interleucina 6), oncogenes (ras) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) tendem a aumentar a expressão de COX-2, ajudando a promover a angiogênese e a invasividade do tumor, que é mediada pelo aumento da atividade das metaloproteinases 2 e 9 (LAVALLE et al., 2009). As metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2, MMP-9) têm sido associadas com a progressão de tumores malignos e a formação de metástases, tanto em tumores humanos como caninos (ARESU et al., 2011).

Em seu estudo, DE NARDI (2007) verificou que a expressão de COX-2 foi superior nas neoplasias malignas em relação às benignas; além disto, a intensidade de imunorreatividade também foi maior nas lesões neoplásicas malignas. O mesmo foi observado por QUEIROGA et al. (2005), que detectaram que as concentrações de COX-2 foram significativamente altas nos tumores malignos (carcinomas inflamatórios ou não) comparados com os benignos e displásicos.

QUEIROGA et al. (2005) também verificaram que os níveis de COX-2 estavam correlacionados com várias características de parâmetros clínicos de malignidade, como tamanho grande do tumor, ulceração, aderência à pele, aderência a tecidos subjacentes e tipos histológicos mais agressivos (carcinoma sólido e carcinosarcoma).

Em estudo feito por LAVALLE et al. (2009), pacientes com alta expressão de COX-2 tiveram tempo de sobrevida menor, o que também foi verificado por QUEIROGA et al. (2005), pois os níveis de COX-2 estavam relacionados com tempo livre de doença e sobrevida global reduzidos em cães com tumores malignos mamários que não eram carcinomas inflamatórios.

HELLER et al. (2005) descobriram que os tumores pouco diferenciados expressam COX-2 com maior intensidade quando comparados com os tumores mais diferenciados, como os adenocarcinomas. A expressão de COX-2 é frequentemente observada no citoplasma das células neoplásicas (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012), como é visto na Figura 2.

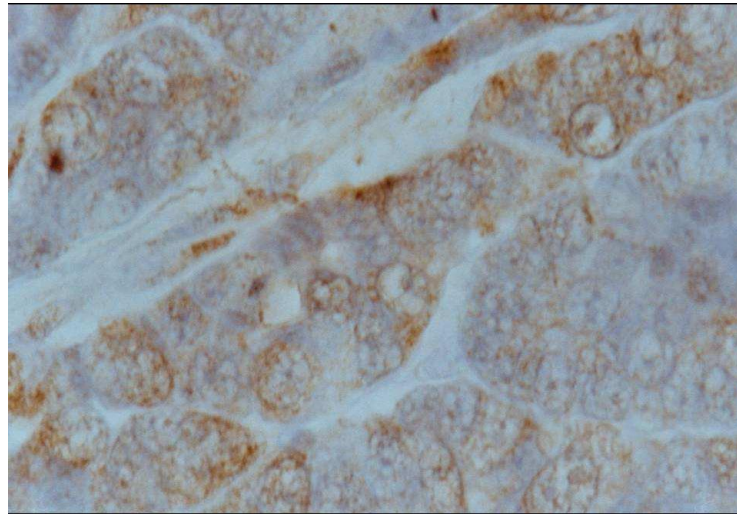


Figura 2 – Adenocarcinoma simples, expressão de COX-2, método imuno-histoquímico (100x). Fonte: BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012.

A marcação imuno-histoquímica de COX-2 representa um valor preditivo em potencial, tendo em vista a possibilidade da associação de inibidores seletivos da COX-2, como o firocoxib, em tratamentos adjuvantes (HORTA et al., 2012). Dessa forma, é possível comprovar o papel da COX-2 na patogênese do câncer e assim sugerir que sua inibição programada, com o uso de antiinflamatórios inibidores seletivos de COX-2, pode ser efetiva na quimioprevenção e tratamento do câncer (DE NARDI, 2007).

2.4 Genes supressores de tumor (p53, BRCA1 e BRCA2)

O gene supressor de tumor p53 desempenha um importante papel no controle do ciclo celular e previne o aparecimento do câncer. A proteína P53 tem o papel de bloquear a divisão em células que sofreram injúrias no seu DNA; caso este mecanismo falhe, a expressão mantida do p53 dispara a cascata da apoptose (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). A ocorrência de mutações específicas no gene p53 está associada com resistência primária à quimioterapia e recidiva precoce em pacientes humanos com câncer de mama. A expressão da proteína P53 defeituosa está relacionada com alta taxa de proliferação tumoral e recorrência precoce da doença (DE NARDI, 2007).

Em seu estudo, DE NARDI (2007) associou a mutação do gene p53 com a malignidade das neoplasias mamárias, pois a expressão para a proteína P53 em todos os casos de carcinoma (carcinoma com prognóstico bom, carcinoma com prognóstico ruim, carcinoma primário metastático, metástase pulmonar e carcinoma inflamatório) foi maior que o grupo dos adenomas. A expressão de p53 é observada nos núcleos das células neoplásicas, e geralmente é maior no grupo dos carcinomas simples e complexos (BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012). A imuno-expressão desse marcador está representada na Figura 3.

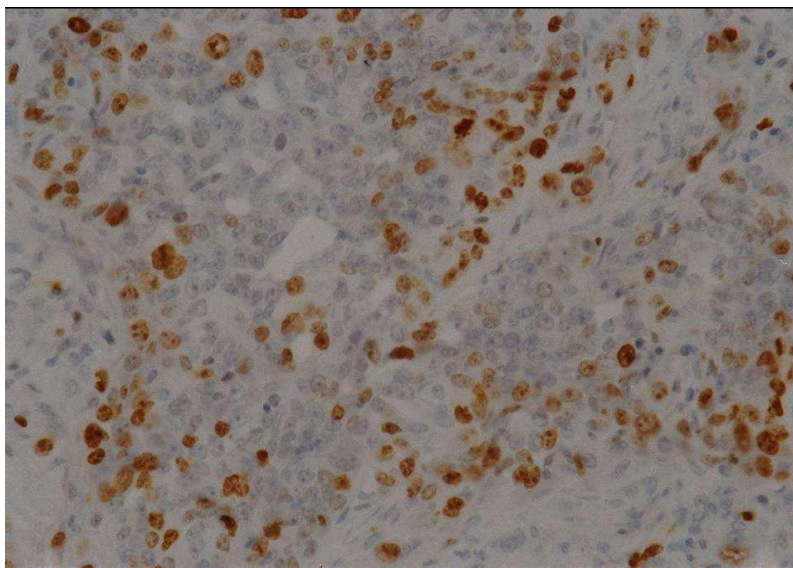


Figura 3 – Adenocarcinoma simples, expressão de p53, método imuno-histoquímico (40x) Fonte: BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, 2012.

DE NARDI (2007) também encontrou que em 70% dos pacientes a sobrevida após a mastectomia foi menor que 24 meses, confirmando que as mutações no p53 estão associadas à baixa sobrevida de pacientes portadores de câncer e seu estudo como marcador prognóstico pode prever o comportamento clínico e a resposta à terapia no câncer de mama.

BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor e desempenham várias funções importantes na manutenção da integridade do genoma. Eles estão envolvidos diretamente em uma série de etapas durante a reparação do DNA, controlam as respostas do ciclo celular e estão envolvidos na segregação cromossômica (O'DONOVAN & LIVINGSTON, 2010).

RIVERA et al. (2009) mostraram que mutações em BRCA1 e BRCA2 estavam associadas com um significativo aumento do risco de desenvolvimento de tumor mamário em cães da raça English springer spaniels. Perdas no gene BRCA1 desestabilizam o genoma, aumentando as taxas de mutação dos genes, incluindo os genes supressores de tumor, como o p53, o que leva à formação de tumores (DENG & SCOTT, 2000, NIETO et al., 2003, RIVERA & von EULER, 2011).

ROBSON et al. (2004) demonstraram que mutações em BRCA1 estão associadas com sobrevida reduzida, diferente das mutações em BRCA2, porém o prognóstico pode ser melhorado com tratamento quimioterápico adjuvante. GOODWIN et al. (2012), por sua vez, demonstraram que mulheres com câncer de mama e mutações em BRCA1 e BRCA2 têm pior prognóstico que as mulheres diagnosticadas com câncer de mama que não possuem mutações em BRCA.

As mutações em BRCA1/BRCA2 frequentemente manifestam características patológicas e biológicas adversas, como alto grau histológico, negatividade para receptores hormonais e mutações em p53 (GOODWIN et al., 2012).

2.5 Proliferação celular

A avaliação da proliferação celular tem sido útil para a determinação do comportamento biológico e o potencial de malignidade dos tumores (SARLI et al., 2002). Atualmente existem técnicas que permitem a avaliação, por imunohistoquímica da proliferação celular pela detecção e quantificação de proteínas celulares que somente existem durante a proliferação celular. Vários antígenos têm sido identificados, incluindo o Ki-67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (EISENBERG & KOIFMAN, 2001). Alguns anticorpos ligam-se apenas às células em replicação, o que permite a avaliação da taxa de proliferação tumoral que, por sua vez, pode ser associada ao prognóstico (HORTA et al., 2012).

Tumores bem diferenciados tendem a ter baixo índice de proliferação, enquanto que os de alto grau tendem a ter alto índice de proliferação, tanto Ki-67 quanto PCNA. Os tumores que apresentam altas taxas de proliferação celular, na grande maioria das vezes, são tumores de alto grau de malignidade e (EISENBERG & KOIFMAN, 2001) apresentam curso mais agressivo com aumento do risco de metástases, mas melhor resposta à quimioterapia (HORTA et al., 2012).

AMORIM et al. (2008) demonstraram, que assim como no câncer de mama em humanos, os altos índices proliferativos estão associados com a ausência da expressão de receptores hormonais, confirmando que existe uma correlação inversa entre o *status* dos receptores esteroidais e os índices proliferativos nos tumores mamários caninos.

A presença de ulceração pode ser considerada um fator prognóstico desfavorável quando associada à expressão de PCNA. Se for levado em consideração que a ulceração resulta do rápido crescimento tumoral, que não obtém suprimento sanguíneo adequado, levando à necrose, esse marcador (PCNA) pode confirmar a relação existente entre a taxa de proliferação e a presença de ulceração (ZUCCARI et al., 2008).

ZUCCARI et al. (2008) verificaram que houve expressão de Ki-67 em todo o grupo estudado, com diferentes intensidades. Grande parte dos tumores malignos (63%) teve alta expressão desse marcador, enquanto uma baixa expressão foi observada nos tumores benignos. O mesmo foi observado por QUEIROGA & LOPES (2002), pois a positividade pelo PCNA mostrou uma variação pronunciada entre os diversos tumores benignos e malignos, apresentando os segundos uma imuno-expressão mais acentuada. A expressão de PCNA em um caso de carcinoma inflamatório mamário está representada na Figura 4.

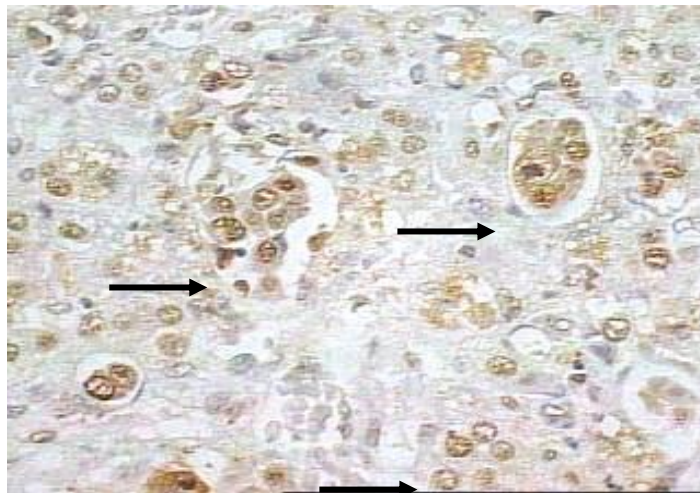


Figura 4 – Imuno-marcação para PCNA em um caso de carcinoma inflamatório mamário. As setas mostram exemplos de núcleos positivamente marcados. Imuno-histoquímica. Fonte: AMORIM et al., 2008.

DE NARDI (2007) encontrou alto índice de proliferação celular (45%) nos carcinomas inflamatórios, mostrando que o carcinoma inflamatório é um tumor que apresenta alta velocidade de crescimento. A Figura 5 representa a imuno-marcação de Ki-67 vista em um caso de carcinoma inflamatório mamário.

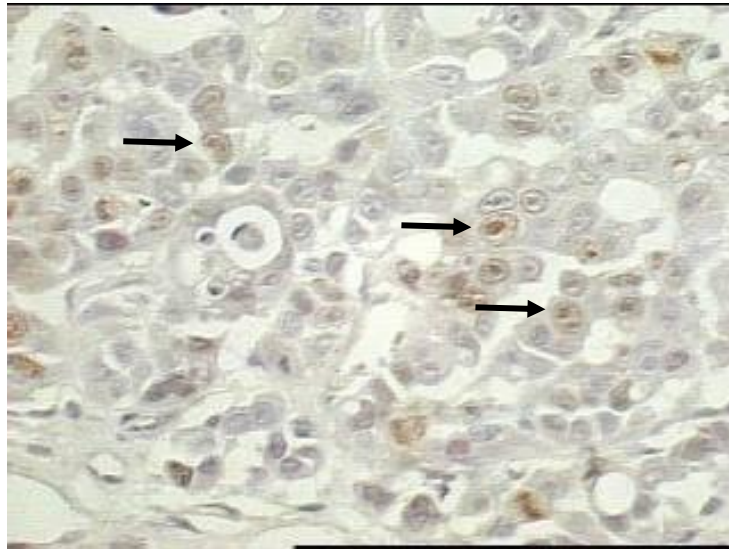


Figura 5 – Imuno-marcação para Ki-67 em um caso de carcinoma inflamatório mamário. As setas mostram exemplos de núcleos positivamente marcados. Imuno-histoquímica. Fonte: AMORIM et al., 2008.

O índice de proliferação do PCNA apresentou valor prognóstico ao revelar uma associação estatisticamente significativa com a sobrevida total (QUEIROGA & LOPES, 2002). A relação entre elevada expressão de Ki-67 e outros fatores conhecidos de pobre prognóstico sugerem que os índices da expressão desse marcador são uma ferramenta importante para indicar o prognóstico de tumores mamários caninos (KADTHUR et al., 2011).

2.6 Células iniciadoras de tumor (CITs)

A teoria mais aceita sobre a etiopatogênese do câncer é que ele se origina de uma única célula que adquire a capacidade de se proliferar indefinidamente (ZANETTI et al., 2011). Células-tronco tumorais são apropriadamente chamadas por este nome devido as suas propriedades de células-tronco, incluindo a capacidade de se dividirem produzindo tanto células-tronco tumorais filhas ou progênes que podem

se dividir e formar tipos celulares tumorais maduros (COCOLA et al., 2009; CLEMENTS & JENKS, 2012).

Células-tronco tumorais de mama, também designadas como células iniciadoras de tumor de mama, possuem competência de auto renovação e diferenciação, assim como células-tronco mamárias normais (SANTILLI et al., 2011; ZANETTI et al., 2011) e, devido a essas habilidades, são alvos de transformações oncogênicas (GUO et al., 2006).

Existe a hipótese de as células-tronco serem células iniciadoras de tumor nos tecidos devido a duas propriedades únicas. Primeiramente, elas têm um tempo mais longo dentro do corpo, permitindo-lhes acumular as múltiplas mutações somáticas necessárias para proliferação celular, ao mesmo tempo em que as mutações alteram/anulam a atividade da enzima-chave em vias importantes para a morte celular programada. Uma segunda propriedade das células-tronco tumorais é a sua capacidade de formar múltiplos tipos celulares maduros diferentes que têm sido frequentemente observados em tumores (CLEMENTS & JENKS, 2012).

No câncer de mama humano, as células neoplásicas com características de células-tronco mais estudadas são aquelas que expressam fortemente o CD44 e que tem expressão baixa ou ausente de CD24 (imunofenótipo CD44+CD24-/low) (ZANETTI et al., 2011). Uma população de células CD44+CD24-/low é mil vezes mais tumorigênica que populações de células que não possuem este imunofenótipo (PHILLIPS et al., 2006). A linhagem tumorigênica CD44+CD24-/low compartilha com células-tronco normais a habilidade de se proliferar intensamente e dar origem a diversos tipos celulares com potencial de desenvolvimento e proliferação reduzidos (ALL-HAJJ et al., 2003, PONTI et al., 2005). Os carcinomas que apresentam este imunofenótipo são agressivos, apresentando alta taxa de metástases, sobretudo metástases ósseas (SANTILLI et al., 2011; ZANETTI et al., 2011; CLEMENTS & JENKS, 2012).

Outro marcador para o fenótipo das células-tronco tumorais de mama é a aldeídodesidrogenase (ALDH). As ALDHs são uma família de enzimas envolvidas na detoxificação de uma variedade de aldeídos. Para identificar as células ALDH positivas, é realizado um ensaio enzimático, utilizando o reagente comercial ALDEFLUOR (LORICO & RAPPA, 2011). O ensaio ALDEFLUOR é baseado na atividade enzimática da aldeídodesidrogenase-1 (ALDH1). A ALDH1 pode ter um papel na diferenciação das células-tronco, e sua alta atividade está associada com

diversos tipos de células hematopoiéticas e progenitoras, tanto em ratos como em humanos (CHARAFE-JAUFRETT et al., 2009).

CD133 também pode ser um bom candidato para explorar a carcinogênese e a progressão tumoral estrógeno-dependente. Em linhagens celulares de tumores mamários (BRCA1), a expressão de células CD133 está associada com propriedades de células-tronco, assim como o fenótipo CD44+/CD24-/low (CHARAFE-JAUFRETT et al., 2009). CD133 é bem mais restrito em sua expressão se comparado com outros marcadores de células-tronco tumorais, como o CD44 e a ALDH, que são expressos universalmente tanto em células normais como tumorais (LORICO & RAPPA, 2011). A expressão de CD133 foi recentemente relatada em 22 de 25 casos de carcinoma inflamatório mamário em mulheres (XIAO et al., 2008).

Alguns estudos indicam que as células iniciadoras de tumor são mais resistentes a terapias anti-proliferativas convencionais (HAN & CROWE, 2009) e à radioterapia (PHILLIPS et al., 2006). A resistência das CITs às drogas anticâncer é hipoteticamente baseada em suas propriedades únicas de reduzir a captação e o efeito de drogas devido a mecanismos de reparo e anti-ímunes, que estão de acordo com a resistência inerente a uma variedade de agentes convencionais (LI et al., 2008; SANTILLI et al., 2011).

Várias características intrínsecas das células-tronco tumorais fazem com que essas células sejam menos suscetíveis à quimioterapia e à radioterapia. Essas características incluem: a presença de bombas de efluxo que permitem que elas excluam corantes; atividade proliferativa relativamente baixa e altos níveis de proteínas anti-apoptóticas; além da presença da ALDH, que metaboliza os fármacos quimioterápicos como a ciclofosfamida; e os fatores angiogênicos que ajudam a manter o nicho da célula-tronco (NAKSHATRI et al., 2009).

A glicoproteína-P é uma bomba de efluxo muito estudada no que se refere à resistência a fármacos anticâncer e é amplamente expressa em vários tipos de tumores humanos. Ela pode detectar e ligar uma grande variedade de fármacos hidrofóbicos assim que entram na membrana plasmática. Esses fármacos incluem muitas das drogas comumente utilizadas na terapia anticâncer, como a doxorrubicina, a vimblastina e a vincristina. A ligação dos fármacos resulta em alterações na conformação da glicoproteína-P e, posteriormente, na liberação desses fármacos para o espaço extracelular (GOTTESMAN, 2002).

O tratamento quimioterápico aumenta a fração de CD44+/CD24low/- e a eficiência na formação de mamosferas em células residuais do tumor após o tratamento, proporcionando assim uma forte evidência de uma subpopulação de células iniciadoras de tumor de mama resistentes à quimioterapia (SANTILLI et al., 2011).

A inibição das principais vias reguladoras responsáveis pela auto-renovação podem aumentar os efeitos da terapia convencional e melhorar os resultados clínicos (LI et al., 2008). As terapias que visam especificamente às vias que estão desreguladas nas células-tronco do tumor de mama podem aumentar a eficiência da radioterapia no futuro (PHILLIPS et al., 2006).

Geralmente uma alta proporção de células-tronco significa um pior prognóstico; no câncer de mama, por exemplo, os tumores menos diferenciados têm a maior carga de células-tronco tumorais. Alta expressão de ALDH também é associada com um prognóstico pobre em diversos tipos de tumores, incluindo o de mama (ALISON et al., 2011), além da formação de metástases no carcinoma inflamatório mamário (CHARAFE-JAUFRETT et al., 2010). As populações ALDEFLUOR-positiva, CD44+/CD24- e ALDEFLUOR-positiva, CD44+/CD133+ exibiram um melhor potencial tumorigênico e metastático (CHARAFE-JAUFRETT et al., 2009).

Com o estudo das CITs algumas mudanças em relação aos tumores de mama vão ocorrer, como a reclassificação dos tumores e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando às células-tronco tumorais (GUO et al., 2006).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As neoplasias mamárias estão entre os tumores mais frequentes em cadelas e são modelo para o estudo do câncer de mama em mulheres. Desta forma, é de extrema relevância o incremento de pesquisas sobre neoplasias de mama na cadela, pois os resultados destes estudos podem beneficiar o tratamento e, quem sabe, a prevenção desta enfermidade nas duas espécies. O uso de marcadores tumorais, tanto em mulheres como em cadelas, auxilia na determinação do prognóstico e da sobrevida dos pacientes. O reconhecimento das células iniciadoras de tumor possibilitará entender melhor outros aspectos da carcinogênese tumoral e, assim, elaborar terapias mais eficazes e direcionadas para cada paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, v.100, n.7, p.3983-3988, 2003.

ALEXANDER, K.; JOLY, H.; BLOND, L.; D'ANJOU, M.A.; NADEAU, MÈ.; OLIVE, J.; BEAUCHAMP, G. A. **Comparison of computed tomography, computed radiography, and film-screen radiography for the detection of canine pulmonary nodules**. Vet Radiol Ultrasound 53(3), p.258-265, 2012.

ALISON, M.R.; LIM, S.M.L.; NICHOLSON, L. **Cancer stem cells: problems for therapy?** Journal of Pathology 223:147-161, 2011.

AMORIM, R.L.; SOUZA, C.H.M.; BANDARRA, E.P.; SANCHES, O.C.; PIZA, E.T. **Immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors and cell proliferative indexes in canine inflammatory mammary carcinoma: 9 cases**. Brazilian Journal of Veterinary Pathology 1(1):16-20, 2008.

ARESU, L.; GIANTIN, M.; MORELLO, E.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; GARBISA, S.; ARICÒ, A.; BRADASCHIA, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors**. BMC Veterinary Research 7:33, 2011.

BADOWSKA-KOZAKIEWICZ, A.M. **Prospective Study of Tumor Markers as Prognostic Factors in the Histopathological Differential Diagnosis of Mammary Gland Neoplasms in Female Canines**. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine, c.12, 2012.

BEAUVAIS, W.; CARDWELL, J.M.; BRODBELT, D.C. **The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs – a systematic review**. Journal of Small Animal Practice, v.53, p.314-322, 2012.

BOCARD, M.; DABUS, D.M.M.; TENTRIN, T.C.; LIMA, G.S.; BARIANI, M.H. **Influência hormonal na carcinogênese mamária em cadelas**. Revista científica eletrônica de Medicina veterinária: Ano VI, n.11, São Paulo, 2008.

BOIANI, M.; GENTILE, L.; GAMBLES, V.V.; CAVALERI, F.; REDI, C.A.; SCHÖLER, H.R. **Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments.** Stem Cells, 23(8):1089-104, 2005.

CASSALI et al., **Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors.** Brazilian Journal Veterinary Pathology, 4(2), p.153-180, 2011.

CHARAFE-JAUFRETT, E.; GINESTIER, C.; BIRNBAUM, D. **Breast cancer stem cells: tools end models to rely on.** BMC Cancer 9:202, 2009.

CHARAFE-JAUFRETT, E.; GINESTIER, C.; IOVINO, F.; TARPIN, C.; DIEBEL, M.; ESTERNI, B.; HOUVENAEGHEL, G.; EXTRA, J.M.; BERTUCCI, F.; JACQUEMIER, J.; XERRI, L.; DONTU, G.; STASSI, G.; XIAO, Y.; BARSKY, S.H.; BIRNBAUM, D.; VIENS, P.; WICHA, M.S. **Aldehyde Dehydrogenase 1-Positive Cancer Stem Cells Mediate Metastasis and Poor Clinical Outcome in Inflammatory Breast Cancer.** Clinical Cancer Research 16:45-55, 2010.

CLEMENTS, M.; JENKS, A. **Breast Cancer Stem Cells.** Breast Cancer v.6, ed.6, p.203-204, 2012.

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.A.; LUVONI, G.C.; ZUCCHI, I. **Isolation of Canine Mammary Cells With Stem Cells Properties and Tumor-Initiating Potencial.** Reprod Dom Anim 44, p.214-217, 2009.

DE NARDI, A.B. **Correlação da cicloxigenase-2 com Ki-67, p53 e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas.** Tese de doutorado, São Paulo, 2007.

DENG, C.X.; SCOTT, F. **Role of the tumor suppressor BRCA1 in genetic stability and mammary gland tumor formation.** Oncogene, 19, p.1059-1064, 2000.

DEPES, D.B.; SOUZA, M.A.; RIBALTA, J.C.L.; ALVES, M.T.S.; KEMP, C.; LIMA, G.R. **Alterações na Expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular e dos Receptores de Estrogênio e de Progesterona Provocadas pela Quimioterapia Primária no Carcinoma de Mama.** RBGO, v.25, n.8, p.545-552, 2003.

DORÉ, M. **Cylooxygenase-2 Expression in Animal Cancers**. Veterinary Pathology 48(1):254-265, 2011.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. **Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura)**. Revista Brasileira de Cancerologia:47(4), p. 377-388, Rio de Janeiro, 2001.

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

FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C.F.; CARDILLI, D.J.; CRIVELARO, R.M.; VICENTE, W.R.R. **Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura**. Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária: Ano IX , n.1, São Paulo, 2012.

FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. **Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovario-histerectomia como terapia adjuvante**. Ciência Rural, v.30, n.4, p.731-735, 2000.

GOBELLO, C.; CORRADA, Y. **Canine Mammary Tumors: An Endocrine Clinical Approach**. Compendium v.23, n.8, 2001.

GOLDSCHMIDT, M.; PENÃ, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. **Classification and Grading of Canine Mammary Tumors**. Veterinary Pathology, 48(1), p.117-131, 2011.

GOODWIN, P.J.; PHILLIPS, K.A.; WEST, D.W.; ENNIS, M.; HOPPER, J.L.; JOHN, E.M.; O'MALLEY, F.P.; MILNE, R.L.; ANDRULIS, I.L.; GILES, G.G.; LONGACRE, T.A. **Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study**. Journal of Clinical Oncology, v.30, n.1, p.19-26, 2012.

GOTTESMAN, M.M. **Mechanisms of Cancer Drug Resistance**. Annu. Rev. Med. 53:615-627, 2002.

GUO, W.; LASKY III, J.L.; WU, H. **Cancer Stem Cells**. International Pediatric Research foundation, v.59, n.4, p.59-64, 2006.

HAN, J.S.; CROWE, D.L. **Tumor initiating cancer stem cells from human breast cancer cell lines**. International Journal of Oncology, v.34, p1449-1453, 2009.

HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHIMIDT, M.H.; HOLT, D.E.; SHOFER, F.S.; SMITH, A.; SORENMO, K.U. **Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Histologic Tumor Type in Canine Mammary Carcinoma**. *Veterinary Pathology* 42:776-780, 2005.

HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B.; CASSALI, G.D. **Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com o auxílio da imuno-histoquímica**. *Ciência Rural*, v.42, n.6, p.1033-1039, Santa Maria, 2012.

KADTHUR, J.C.; RAO, S.; SONNAHALLIPURA, B.M.; THIMMANAHALLI, D.S.; LAXMIKANTH, S.M. **Prognostic Value of Ki 67 Proliferation Antigen in Canine Malignant Mammary Gland Tumours**. *Braz J Vet Pathol*, 4(1), p.36-40, 2011.

KOMATSU, T.; IWANO, H.; EBISAWA, M.; WATABE, A.; ENDO, Y.; HIRAYAMA, K.; TANIYAMA, H.; KADOSAWA, T. **Pathological Classification of Canine Mammary Tumor Based on Quantifying mRNA Levels of Hormonal Receptors, SATB1, and Snail in Tissue and Fine Needle Biopsy Samples**. *J. Vet. Med. Sci.* 74(6):719–726, 2012.

LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.L.F.; CASSALI, G.D. **Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival**. *Veterinary Pathology* 46:p.1275–1280, 2009.

LI, X.; LEWIS, M.T.; HUANG, J.; GUTIERREZ, C.; OSBORNE, C.K.; WU, M.F.; HILSENBECK, S.G.; PAVLICK, A.; ZHANG, X.; CHAMNESS, G.C.; WONG, H.; ROSEN, J.; CHANG, J.C. **Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy**. *J. National Cancer Institute*, v.100, n.9, p.672-679, 2008.

LORICO, A.; RAPPÀ, G. **Phenotypic Heterogeneity of Breast Cancer Stem Cells**. *Journal of Oncology*, p.1-6, 2011.

MacEWEN, E.G.; PATNAIK, A.K.; HARVEY, H.J.; PANKO, W.B. **Estrogen Receptors in Canine Mammary Tumors**. *Cancer Research* 42, 2252-2259, 1982.

MATOS, A.J.; FAUSTINO, A.M.; LOPES, C., RUTTEMAN, G.R.; GÄRTNER, F. **Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumours in dogs by cytokeratin immunostaining**. *Vet Rec* 158:626–630, 2006.

NAKSHATRI, H.; SROUR, E.F.; BADVE, S. **Breast Cancer Stem Cells and Intrinsic Subtypes: Controversies Rage On.** Current Stem Cell Research & Therapy, v.4, n.1, p.50-60, 2009.

NIETO, A.; PEREZ-ALENZA, M.D.; DEL CASTILLO, N.; TABANERA, E.; CASTAÑO, M.; PEÑA, L. **BRCA1 Expression in Canine Mammary Dysplasias and Tumours: Relationship with Prognostic Variables.** J. Comp. Path, v.128, p.260-268, 2003.

NOVOSAD, C.A. **Principles of treatment for mammary gland tumors.** Clinical Technical Small Animals Practice, v.18, n.2, p.107-109, 2003.

O'DONOVAN, P.J.; LIVINGSTON, D.M. **BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair.** Carcinogenesis, v.31, n.6, p.961-967, 2010.

OTONI, C.C.; RAHAL, S.C.; VULCANO, L.C.; RIBEIRO, S.M.; HETTE, K.; GIORDANO, T.; DOICHE, D.P.; AMORIM, R.L. **Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors.** Acta Veterinaria Scandinavica 52:20, 2010.

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

PEREZ ALENZA, M.D.; PEÑA, L.; CASTILLO, N.NIETO, A.I. **Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours.** Journal of Small Animal Practice, v.41, p.284-291, 2000.

PHILLIPS, T.M.; McBRIDE, W.H.; PAJONK, F. **The Response of CD24^{-low}/CD44⁺ Breast Cancer-Initiating Cells to Radiation.** Journal of the National Cancer Institute, v.98, n.24, p.1777-1785, 2006.

PONTI, D.; COSTA, A.; ZAFFARONI, N. **Isolation and *In vitro* Propagation os Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties.** Cancer Res 65, p.5506-5511, 2005.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. **Tumores mamários caninos – novas perspectivas.** In: Congresso de Ciências Veterinárias, Oeiras, 2002. Anais... p.183-190, 2002.

QUEIROGA, F.; PEREZ-ALENZA, M.D.; SILVAN, G.; PEÑA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J.C. **Cox-2 Levels in Canine Mammary Tumors, Including Inflammatory Mammary Carcinoma: Clinicopathological Features and Prognostic Significance.** *Anticancer Research* 25:4269-4276, 2005).

RUTTEMAN, G.R.; MISDORP, W.; BLANKENSTEIN, M.A.; VAN DER BROM, W.E. **Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: Different receptor profile in non-malignant and malignant states.** *Br. J. Cancer* 58, 594-599, 1988.

RIVERA, P.; von EULER, H. **Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors.** *Veterinary Pathology*, 48(1), p.132-146, 2011.

RIVERA, P.; MELIN, M.; BIAGI, T.; FALL, T.; HÄGGSTRÖM, J.; LINDBLAD-TOH, K.; von EULER, H. **Mammary Tumor Development in Dogs Is Associated with BRCA1 and BRCA2.** *Cancer Res*, 69 (22), p.8770-8774, 2009.

ROBSON, M.E.; CHAPPUIS, P.O.; SATAGOPAN, J.; WONG, N.; BOYD, J.; GOFFIN, J.R.; HUDIS, C.; ROBERGE, D.; NORTON, L.; BÉGIN, L.R.; OFFIT, K.; FOULKES, W.D. **A combined analysis of outcome following breast cancer: differences in survival based on BRCA1/BRCA2 mutation status and administration of adjuvant treatment.** *Breast Cancer Research*, v.6, n.1, 2004.

SANTILLI, G.; BINDA, M.; ZAFFARONI, N.; DAIDONE, M.G. **Breast Cancer-Initiating Cells: Insights Into Novel Treatment Strategies.** *Cancers*, v.3, p.1405-1425, 2011.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P.S. **Prognostic Value of Histologic Stage and Proliferative Activity in Canine Malignant Mammary Tumors.** *J Vet Diagn Invest*, 14, p.25-34, 2002.

SCHINEIDER, R. **Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer.** *Cancer*, v.26, n.2, p.419-426, 1970.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. **Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes.** *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.625-633, Santa Maria, 2004.

SORENMO, K. **Canine mammary gland tumors.** *Vet Clin Smal Anim*, v.33, p. 573-596, 2003.

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

TODOROVA, I. **Prevalence and etiology of the most common malignant tumours in dogs and cats.** *Bulg. J. Vet. Med.*, 9, No 2, 85–98, 2006.

XIAO, Y.; YE, Y.; YEARSLEY, K.; JONES, S.; BARSKY, S.H. **The Lymphovascular Embolus of Inflammatory Breast Cancer Expresses a Stem Cell-like Phenotype.** *The American Journal of Pathology*, v.173, n.2, p.561-574, 2008.

ZANETTI, J.S.; OLIVEIRA, L.R.; RIBEIRO-SILVA, A. **Câncer de mama: De perfis moleculares a células tronco.** *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v.9, n.1, p.277-292, Três Corações, 2011.

ZUCCARI, D.A.P.C.; BERTON, C.R.; TERZIAN, A.C.B.; RUIZ, C.M. **Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo.** *Arq Ciênc Saúde* 2008 out/dez, p.189-198, São Paulo.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUIZ, C.M.; ANDRADE, J.C. **Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 28(4):207-215, 2008.