



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto



Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor

Aluna: Gabriela Karam Rebolho
Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Claudia Regina Bonini Domingos

Relatório apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de São José do Rio Preto.

São José do Rio Preto
2022

Gabriela Karam Rebolho (KARAM, G. R)

Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc: 2019/11360 - 4

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto
2022

Rebolho, Gabriela Karam

R292q

Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor / Gabriela Karam Rebolho.
-- São José do Rio Preto, 2022
30 p.: il., tabs.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Claudia Regina Bonini Domingos.

1. Tumor mamário canino. 2. Quimiorresistência. 3. PARP. 4. Inibidor de PARP. 5. Olaparib. I. Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor.

Gabriela Karam Rebolho (KARAM, G. R.)

**Quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua
relação com a PARP e seu inibidor**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc: 2019/11360 - 4

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Mestre Lucas Ramos Pereira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Regina Chinelato Fernandes
UNIP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
06 de janeiro de 2022

Dedicatória

Àqueles que, apesar de todas as adversidades, sempre acreditaram que eu seria capaz de atingir meus objetivos, e principalmente, aos meus pais, **Christiane** e **Valmir**.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos, por ter me acolhido durante todos os anos da graduação. Jamais mediu esforços para me auxiliar e aconselhar durante o período de pesquisa, conseqüentemente, agradeço por ter aberto as portas do mundo da ciência. Serei eternamente grata por ter te conhecido e por ter aproveitado ao máximo ao seu lado.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, pelos ensinamentos básicos e por ter me auxiliado juntamente com a Prof^a. Dr^a. Claudia Bonini nas pesquisas na área de oncologia e biologia molecular. Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente aos meus pais, Christiane e Valmir, por serem a minha base, por nunca me deixarem desistir e por me auxiliarem na construção pessoal e profissional que sou hoje. Sou grata por cada conversa e conselho durante todos esses anos de dedicação. Essa vitória é nossa.

Agradeço a minha falecida avó Maria Rosa por nunca ter me deixado desistir de estudar, por me motivar e mostrar que o caminho dos estudos sempre será o melhor. Mesmo sendo a minha estrela guia, sempre me mostrou que desistir jamais será o melhor caminho e que, aprender coisas novas pode ser divertido e nos tornar diferentes.

Ainda agradeço aos meus avós paternos, Judith e Valdir, que mesmo de longe acompanharam cada etapa do meu processo e rezaram pelas minhas conquistas.

Agradeço aos meus familiares, tios e primos, por sempre estarem ao meu lado perguntando como andavam os meus estudos. Tia Day, tio Marcelo, tia Gleyza, tio Fauze, tia Fabiana, Beatriz, Luis Felipe, Maria Júlia e Marcella, obrigada por acompanharem o meu desenvolvimento profissional e por sempre torcerem por mim, vocês foram essenciais para a minha construção.

Agradeço imensamente ao meu namorado, Guilherme Santana, por estar comigo todos os dias desde o início da graduação. Você me acolheu durante todos os momentos difíceis e nos melhores também. Sou grata por toda força e por não deixar que eu desistisse no meio do caminho.

Agradeço aos meus grandes amigos, não menos importante, Ana Beatriz Belini, Danilo Donizete, Eduardo Faria, Jorge Lucas e Vanessa Rezende, por me acolherem durante todos os anos da faculdade e pelos grandes ensinamentos que trouxeram, fazendo com que os anos de graduação fossem mais divertidos e leves. Crescemos juntos profissionalmente e essa amizade quero ter eternamente no meu coração e para o resto da vida.

Agradeço às pessoas que deixaram meus dias no laboratório mais leves. Me refiro a Francine, Marina Gobbo, Jaqueline e Gustavo. Vocês foram mais do que companheiros de laboratório, foram mais que essenciais para tudo isso. Obrigada por estarem lá comigo sempre que precisei.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida até aqui, que de uma certa forma ou de outra, também somaram para o meu crescimento. Vocês foram extremamente especiais para mim, cada um com seu jeito, cada qual com sua função. Vocês fazem parte dessa conquista.

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/11360-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Sem a bolsa, não seria possível adquirir alguns conhecimentos que tive em congressos e palestras, nacionais e internacionais.

Sendo assim, posso dizer que a ciência nunca é feita e jamais anda sozinha. Cada um que esteve comigo nessa caminhada, com suas características específicas, formaram minha base, meu alicerce para chegar aonde cheguei.

Epígrafe

Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser...mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

(Martin Luther King, 1985)

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o tipo tumoral com maior prevalência entre as mulheres e possui alta taxa de mortalidade, atribuída à falha na detecção precoce da doença e ausência de marcadores efetivos. Nos cães, cerca de 50% dos tumores mamários são diagnosticados como malignos. Desse modo, o CM canino compartilha muitas semelhanças com estes tumores em mulheres, o que os torna excelentes modelos para o estudo da biologia do câncer e testes de agentes terapêuticos. Sabe-se que, os protocolos de quimioterapia que proporcionam um tratamento adjuvante em cães ainda possuem aplicação limitada e a cirurgia ainda é o tratamento mais utilizado para essas pacientes. O CM canino é caracterizado pela alta heterogeneidade intra e intertumoral, assim denominadas pela coexistência de diferentes clones de células tumorais os quais podem ser formados a partir do crescimento desordenado com uma vascularização desigual, assim como pela exposição prolongada a medicamentos quimioterápicos. Essa exposição medicamentosa causa danos no DNA, e proteínas conhecidas como poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) são responsáveis pela reparação desses danos. Dessa forma, por meio da alta expressão da proteína de reparo (PARP), as células tumorais podem se tornar quimiorresistentes, podendo levar à recidiva e metástase tumoral. Diante disso, uma alternativa inovadora é a utilização de inibidores de PARP (PARPi) como tratamento, que já são utilizados para o CM humano e, podem contribuir para diminuição de recidivas tumorais. Este estudo visou verificar a expressão gênica e proteica do PARP em células de linhagem tumoral canina (CF41) resistentes ou não, além da eficiência do uso de PARPi (Olaparib) nas células controle e quimiorresistentes. As células foram cultivadas e expandidas e em seguida foram induzidas à resistência por meio do tratamento com Carboplatina 10 μ M durante 2 a 3 semanas. Após o estabelecimento da quimioresistência tumoral, foi realizado o Ensaio de Viabilidade Celular (MTT) que definiu a dose do medicamento para tratamento das células resistentes o qual foi verificado pela técnica de PCR em tempo real e imunofluorescência, respectivamente. Finalmente, os resultados desse projeto confirmam a importância da expressão da PARP nestas neoplasias em cadelas bem como elucidam os mecanismos de resistência em CM e propõem um tratamento eficiente da recidiva tumoral.

Palavras-chave: Tumor mamário canino. Quimiorresistência. PARP. Inibidor de PARP. Olaparib.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the tumoral type which is more prevalent among women, and it has a high mortality rate, due to failure in detecting it early and to the absence of effective markers as well. In dogs, approximately 50% of the mammary tumors are diagnosed as malignant. Thus, the canine mammary tumor (CMT) resembles a great deal with those tumors in humans, which make them excellent models for the study of the cancer biology and therapeutic agents tests. It's known that the chemotherapy protocols which provide an adjuvant treatment in dogs still have limited application and so surgery is yet the most used treatment for these patients. The CMT is characterized by high intra and intertumoral heterogeneity, thus named for the coexistence of different tumoral cell clones which can be formed from their disordered growth with uneven vascularization, as well as prolonged exposure to the chemotherapy medication which may contribute to the damage caused to the DNA. The damage is repaired by proteins known as poly (ADP – ribose) polymerase (PARP) that are activated under those conditions. In this case, an innovative alternative is the use of PARP (PARPi) inhibitors as a treatment, since they are already studied for the human breast cancer and can, therefore, contribute to the decrease of the tumor recurrence. This study aims to verify the genetic and protein expression of PARP in canine tumoral line cells (CF41) and the effectiveness of the use of PARPi (Olaparib) in the control and chemo resistant cells. The cells are cultivated and expanded in order to be induced to resistance through the treatment with carboplatin 10 μ M for two to three weeks. After the chemoresistance is established, the Cellular Viability Assay (MTT) will be done, which will define the dose of the medication for the treatment of the non and the resistant cells. The genetic and protein expression analysis of the PARP from the post-treatment cells will be done through the PCR technique in real time and immunofluorescence respectively. To sum up, the results of this project confirm the amount of the DNA repair through the PARP on this neoplasia in dogs in addition elucidate the mechanisms of the BC resistance, besides proposing an efficient treatment for the tumoral recurrence.

Keywords: Canine mammary tumor. Chemoresistance. PARP. Inhibitor of PARP. Olaparib.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP)	16
Figura 2. Células controle da linhagem CF41 com confluência de aproximadamente 80%	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da análise da expressão proteica do PARP1 por imunofluorescência expressos em média e $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$)	22
Tabela 2. Dados da análise da expressão gênica por qPCR, expressos em média $\pm$ desvio padrão	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM	Câncer de Mama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
CSCs	Células Estaminais Cancerosas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PARPi	Inibidores de Poly (ADP-ribose) polymerase
BC	Breast Cancer
CMT	Canine Mammary Tumor
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
CEUA	Comitê de Ética do Uso de Animais
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Soro Fetal Bovino
PCR	Polymerase Chain Reaction
MTT	Ensaio de Viabilidade Celular
DMSO	Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetil
PBS	Phosphate-buffered saline
RNA	Ácido Ribonucleico
cDNA	Complementary DNA
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RQ	Quantificação Relativa
qPCR	Real Time quantitative PCR

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por Cento
μM	Micromolar (10^{-6} mol/L)
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
nM	Nanomolar (10^{-9} mol/L)
nm	Nanômetro
min	Minutos
h	Hora
ng	Nanograma
mL	Mililitro
s	Segundo

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Objetivos.	16
	2.1 Objetivos Gerais	16
	2.2 Objetivos Específicos	17
3	Metodologia.	18
	3.1 Considerações Éticas	18
	3.2 Cultivo Celular	18
	3.3 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).	18
	3.4 Grupos e Tratamentos dos Experimentos <i>in vitro</i>	19
	3.5 Indução à resistência	19
	3.6 Imunofluorescência	19
	3.7 RT-PCR quantitativa (qPCR)	20
	3.8 Análise dos Resultados	20
4	Resultados	21
	4.1 Cultivo Celular	21
	4.2 Teste de Viabilidade Celular (MTT)	21
	4.3 Tratamento Celular	22
	4.4 Imunofluorescência	23
	4.5 RT-PCR quantitativa (qPCR)	24
5	Discussão.	25
6	Conclusão	27
	Referências	28
	ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – FAMERP).	31
	ANEXO B – Certificado de Participação e Apresentação de trabalho no XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp	32
	ANEXO C – Classificação da 1º fase da Apresentação de Trabalhos no XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp	33
	ANEXO D – Certificado de Apresentação de trabalho no XVII CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e V Congresso Científico FAMERP/FUNFARME	34

ANEXO E – Certificado de Participação no VII Internacional Symposium 35
on Translational Oncology

1 Introdução

O câncer de mama (CM) é uma doença causada pela multiplicação desordenada das células epiteliais que compõem a glândula mamária, e que consequentemente, levam ao estabelecimento tumoral. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, o CM é prevalente em mulheres, e em 2021 foram estimados 66.280 novos casos. Ainda afirmam que, o câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em mulheres de todas as regiões, após o câncer de pele não melanoma. Com isso, a alta taxa de mortalidade por CM nos países em desenvolvimento, pode estar associada à falha na detecção precoce da doença e ausência de marcadores efetivos para estimar e prever a resposta tumoral às terapias (CHERDYNTSEVA *et al.*, 2017), além da alta incidência a partir dos 40 anos de idade (INCA, 2021).

Na medicina veterinária, cerca de 30 – 50% dos tumores em cadelas são diagnosticados como malignos (MARCONATO *et al.*, 2019). Em países latinos e europeus em que a ovariossalpingohisterectomia (OSH) não é aplicada habitualmente, os tumores mamários em cadelas são muito comuns. No Brasil, por exemplo, a OSH vem sendo realizada há muito tempo em uma pequena parcela da população canina, fato que pode explicar a alta ocorrência dos tumores nas glândulas mamárias das cadelas (ANDRADE & BITTENCOURT, 2013). Em contrapartida, nos Estados Unidos, há trinta anos, a OSH surgiu com o objetivo de diminuir a superlotação dos abrigos de cães e gatos, fazendo com que posteriormente se tornasse lei no país (ANDRADE & BITTENCOURT, 2013) e comumente fosse realizada em cadelas em idade precoce (MEDEIROS *et al.*, 2017), tornando a neoplasia mamária insignificante nessa população.

Há muitas semelhanças entre os CM caninos e humanos, dentre as quais as características histopatológicas, os biomarcadores moleculares, a resposta tumoral frente aos tratamentos, entre outros (HUSSAIN *et al.*, 2018). Portanto, os cães são considerados excelentes modelos para o estudo da biologia do câncer e testes de agentes terapêuticos.

Os carcinomas mamários caninos são comuns em cadelas com idade entre 6 e 14 anos, sendo que três fatores principais afetam o risco de desenvolver essa neoplasia: idade, oscilações hormonais e raça (OSAKI *et al.*, 2016). Estudos como SONREMO *et al.* (2011) certificam que a chance de uma cadela desenvolver tumor primário de mama aumenta com o passar dos primeiros ciclos estrais. Esse estudo ainda reporta que cadelas castradas antes do primeiro ciclo, possuem 0,5% de chances de desenvolver CM, contrapõe com o índice de 8% e 26% para cadelas castradas entre o primeiro e o segundo cio ou após o segundo cio, respectivamente. Sabe-se que, os protocolos de quimioterapia que proporcionam um tratamento adjuvante em

cães ainda possuem aplicação limitada. Deste modo, a literatura afirma que a cirurgia ainda é o tratamento mais efetivo para pacientes caninos (DE CAMPOS *et al.*, 2018).

A partir disso, um dos fatores-chave responsáveis pela falha terapêutica e a resistência às drogas, é a heterogeneidade inter e intratumoral (MCGRANAHAN & SWANTON, 2017; SCHÜRCH *et al.*, 2018). A heterogeneidade intertumoral descreve uma variabilidade morfológica, imunofenotípica e de eventos epigenéticos, respostas terapêuticas e resultados clínicos entre tumores da mesma paciente. Em contrapartida, a heterogeneidade intratumoral, designa uma variabilidade de clones dentro de um único tumor de uma paciente.

Com isso, mecanismos, como angiogênese, transporte de nutrientes e uso de medicamentos, são capazes de conduzir às multiplicações desordenadas de células subclonais a partir de um clone progenitor comum, resultando em variação espacial entre diferentes regiões do tumor, progressão da doença e resistência ao tratamento (GONZÁLEZ-MONTOYA *et al.*, 2018; SCHÜRCH *et al.*, 2018).

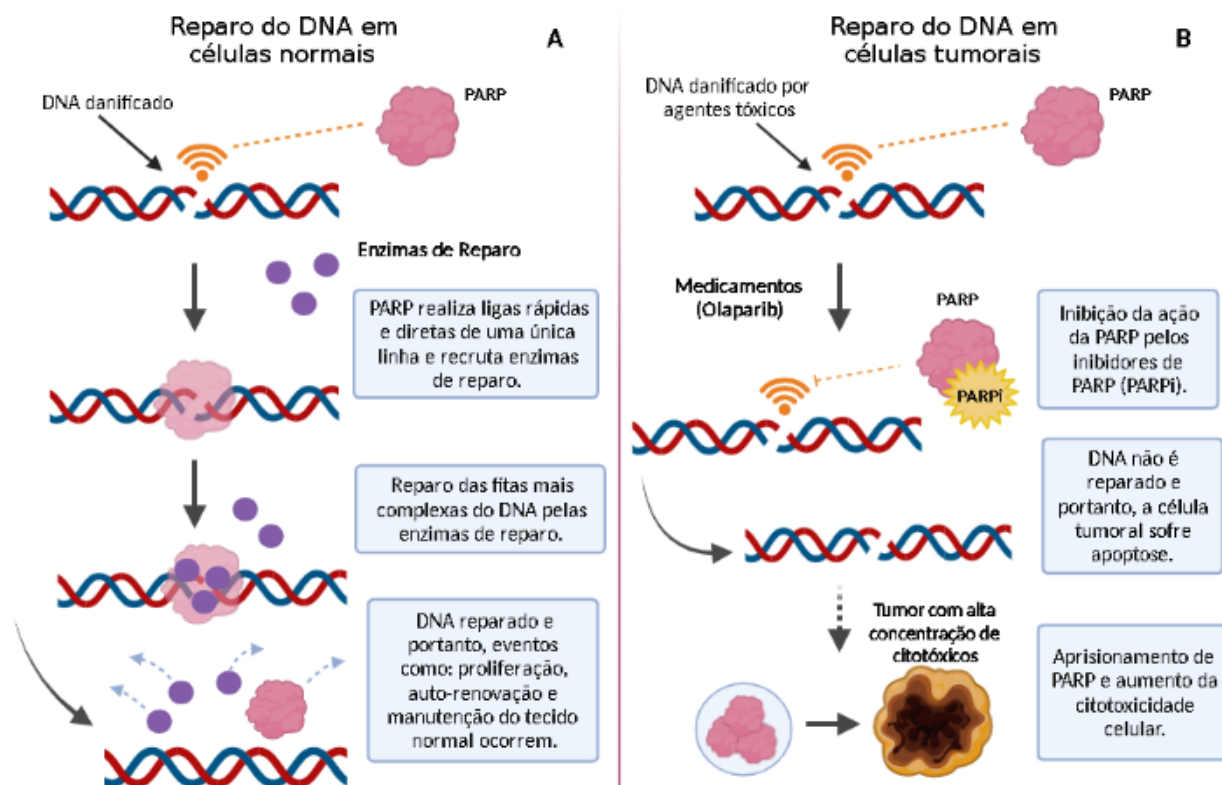
Os efeitos dessa heterogeneidade tumoral refletem sobre a terapia realizada e a sobrevivência celular. Em humanos, mesmo após um contínuo tratamento com quimioterápicos proposto pelos médicos e cirurgias bem invasivas, mais de 50% dos pacientes acabam por apresentar recidiva da doença, porém de forma mais agressiva (DEY & RATHOD & DE, 2019). Assim, essa recidiva tumoral pode ser estudada em cães, uma vez que a cirurgia realizada como tratamento curativo, não tem efeito protetor sobre o aparecimento de novos nódulos ou sobre a taxa de sobrevida das cadelas (FONSECA & DALECK, 2000).

Com isso, vestígios de células tumorais podem ser encontrados mesmo após o procedimento e conseguem permanecer quiescentes por um determinado tempo, retornando à atividade celular após algum estímulo. Essas células que estão quiescentes são conhecidas como células-tronco tumorais ou ainda, células estaminais cancerosas (CSCs) (TODEN *et al.*, 2019). Sendo assim, muitas vezes não são sensíveis ao tratamento, por se manterem adormecidas (YANG *et al.*, 2019) por um longo período (PAN *et al.*, 2017). A capacidade de recidiva é explicada pela grande capacidade das CSCs de restabelecer suas atividades e auto-renovarem, diferenciarem e proliferarem como células-tronco normais (PRASAD *et al.*, 2019), alcançando locais distantes (QUAYLE & OTTEWELL & HOLEN, *et al.*, 2018).

Portanto, torna-se pertinente elucidar de forma efetiva e minuciosa também os mecanismos envolvidos na quimiorresistência. A exposição prolongada aos medicamentos permite que as células tumorais adquiram mecanismos de reparo do DNA o qual é adulterado pelos medicamentos. Esses reparos são realizados por proteínas conhecidas como poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) que são ativadas sob tais condições (figura 1.(A)) e recrutam o

grupo de enzimas de reparo (ABECASSIS *et al.*, 2019). Diante disso, uma alternativa inovadora é a utilização de inibidores de PARP (PARPi) que, *in vitro*, quimiossensibilizam as linhagens celulares do CM (JARRAR *et al.*, 2019). Evidências indicam que, além da inibição catalítica da atividade de PARP, os PARPi induzem complexos citotóxicos de PARP-DNA através de “aprisionamento” da PARP e consequentemente o aumento da citotoxicidade dos agentes alquilantes nas células (ABECASSIS *et al.*, 2019). Além do mais, a inibição da enzima PARP pode ser considerada um alvo terapêutico, uma vez que as CSCs quando danificadas (figura 1. (B)), não conseguem reparar a fita do seu DNA e por consequência, não são capazes de se auto-renovarem, proliferarem e realizarem a manutenção do tumor (JARRAR *et al.*, 2019).

Figura 1. Ação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). **(A)** No reparo do DNA em células normais, quando o DNA é danificado, um sinal químico é enviado para a PARP a qual inicialmente realiza ligas rápidas, diretas e superficiais das fitas de DNA. Com isso, passa a recrutar enzimas de reparo as quais trabalham juntamente para recuperar a fita do DNA por completo. Com o seu reparo essas enzimas desligam-se das fitas e as células voltam a sua atividade normal (proliferam, autorrenovam e realizam a manutenção do tecido). **(B)** Quando ocorre a exposição à medicamentos prolongados, o reparo do DNA pela PARP é inibido pelos inibidores de PARP, no caso, o Olaparib. De certa forma, a fita do DNA continua danificada e, portanto, sofre apoptose, onde consequentemente, não ocorrem os eventos de reparação celular. Com isso, ocorre o aprisionamento da PARP e consequentemente o aumento dos agentes citotóxicos alquilantes na célula e portanto, morte do tecido.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Esse mecanismo de estudo em linhagens de células tumorais humanas já é aplicado com o propósito de reduzir a progressão tumoral. Em contrapartida, o uso de PARPi com tal propósito ainda não foi descrito na espécie canina, já que não são encontrados estudos sobre a PARP em cadelas. Apesar disso, a relação entre o inibidor de PARP e as diferentes mutações em diversos tipos de câncer tem sido descrita na literatura, com o objetivo de incluir o tratamento com PARPi na medicina personalizada em combinação com a quimioterapia convencional, na tentativa de aprimorar sua eficácia e atenuar os efeitos adversos, diminuir as taxas de mortalidade e melhorar a qualidade de vida (BENAFIF & HALL, 2015).

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho visa verificar a expressão gênica e proteica da PARP em células da linhagem tumoral canina CF41 resistentes e controles, além da eficiência do uso do inibidor Olaparib. Ainda, proporcionar um tratamento mais eficiente e minimizar as chances de recidiva tumoral e também elucidar os mecanismos de resistência em CM humano.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Desenvolver a quimiorresistência com Carboplatina nas células da linhagem CF41.
- b. Verificar a expressão gênica e proteica do PARP nas células resistentes em relação às células não resistentes.
- c. Tratar as células quimiorresistentes ou não com o inibidor do PARP (Olaparib) e comparar os resultados entre as mesmas

3 Metodologia

3.1 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA (Protocolo FAMERP n°001-003673/2017).

3.2 Cultivo Celular

Para a realização do estudo *in vitro*, foram utilizadas células da linhagem tumoral mamária canina CF41 (ATCC® CRL-6232TM) que por sua vez, apresenta um formato fusiforme cujas células são originadas a partir de carcinoma (XAVIER *et al.*, 2018). A linhagem celular CF41 foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's high glucose (DMEM com altas concentrações de glicose) (Cultilab®) suplementado com 10% de FBS (Cultilab®) e 1% de antibiótico e antimicótico (penicilina e estreptomicina – anfotericina respectivamente). As células em cultivo foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5 % de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias com o propósito de estimular o crescimento das células. Quando apresentaram 80-100% de confluência, foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer com solução de azul de tripan a 4 % para verificar o número de células viáveis, foram então transferidas para frascos de cultivo específicos para a indução da quimiorresistência e posteriormente para análise da expressão proteica (imunofluorescência) e expressão gênica (PCR em tempo real).

3.3 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi analisada por meio de ensaio colorimétrico MTT (3{4,5-dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo). As células foram colocadas em placas de 6 poços, contendo, 1×10^6 células/poço em meio de cultura com tratamento diluído. Posteriormente o meio com tratamento foi retirado e adicionado em cada poço, 100 µL de solução de MTT – 12nM do kit Vibrant MTT Cell Proliferation Assay (Invitrogen®)- diluído na concentração de 1mg/mL de meio puro (DMEM). Com isso, a placa foi incubada por 40 minutos a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse período, todo o conteúdo foi novamente retirado para posterior adição de 100 µL de dimetilsulfóxido 100% (DMSO). As placas foram colocadas sob agitação por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan. Então, a leitura em absorbância no leitor de ELISA (ThermoPlate®) sob comprimento de onda 570 nm foi realizada.

3.4 Grupos e Tratamentos dos Experimentos *in vitro*

No decorrer do cultivo, ao atingirem 80% de confluência, as células foram divididas em 2 grupos. O grupo I é utilizado como grupo controle, sendo que as células foram cultivadas em meio de cultura (DMEM), sem nenhum aditivo. Em contrapartida, no grupo II, as células foram tratadas com Carboplatina por 3 semanas.

Posteriormente, as células serão tratadas com diferentes concentrações do inibidor de PARP, Olaparib (0-50 μ M por 48 -72h), criando uma curva dose-resposta para a determinação concentrações inibitórias semi-máximas (IC₅₀).

Além dos grupos destacados, ainda teríamos um grupo (grupo III) que será aplicado apenas a concentração de Olaparib definida pela IC₅₀ de modo a mostrar a sua eficiência e outro grupo (grupo IV) o qual será resultado da resistência do grupo II, sendo ele, a combinação da Carboplatina e o Olaparib, de modo também, a mostrar a eficiência da combinação dos dois medicamentos.

3.5 Indução à resistência

A indução à resistência foi aplicada conforme o protocolo desenvolvido por ACHUTHAN *et al.*, (2011). Foi adicionada Carboplatina em uma concentração de 10 μ M no grupo II. O tratamento foi trocado a cada 3 dias por cerca de 3 semanas. Assim, grande quantidade de células CF41 sofreram apoptose, restando apenas algumas células que por indução ao quimioterápico passaram a ficar resistentes, apresentando um aspecto mais alongado e com um núcleo bem evidente.

3.6 Imunofluorescência

Após os processos descritos nos itens 3.1 a 3.5, foi realizada a técnica de imunofluorescência para a analisar a expressão proteica do PARP (Thermo Scientific, 436400, MA, USA) de acordo com LEONEL *et al.*, (2017). Primeiramente, as células da linhagem tumoral mamária canina foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 (Sigma-ALdrich®) por 10 minutos a 40 °C sob agitação. Então, as lâminas foram lavadas com PBS/glicina (3 vezes por 15 min cada) seguido do bloqueio da peroxidase por 1h em temperatura ambiente e incubação com os anticorpos primários específicos, overnight a 4 °C sob agitação. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas novamente (3 vezes por 15 min cada) e incubadas com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente. Ao final, as lâminas foram incubadas com DAPI (Invitrogen®) seguido da adição do ProLong® Gold (Invitrogen®). As lâminas foram analisadas em microscópio

confocal em filtro de comprimento de onda para a cor azul de 405 nm e para a cor verde de 488 nm. A reação foi realizada em triplicata e a quantificação da expressão proteica foi realizada com o auxílio do *software* Image J.

3.7 RT-PCR quantitativa (qPCR)

O RNA total foi extraído da linhagem tumoral CF41 pelo método TRIZOL (Invitrogen Life Technologies – São Paulo, Brasil). A fita de cDNA foi sintetizada utilizando o Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) em um volume total de 20 uL das misturas da reação na concentração final de 100 ng/uL de cDNA. A expressão quantitativa foi realizada por meio de RT-PCR em triplicata utilizando o Sistema Step one Plus (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e um controle negativo foi incluído em cada reação. As reações de PCR possuem 100 ng de cDNA, 10 mL TaqMan Universal Master Mix, 8 mL de solução de água DEPC, 1 mL TaqMan Gene Expression para PARP, que foram submetidos ao seguinte esquema de amplificação: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 min.

Os níveis de transcrição dos genes de interesse, PARP1, foram normalizados pelos genes HPRT1 e RPLPO usados como controle interno de expressão. Para a análise da expressão dos genes, foram utilizados os ensaios TaqMan (Applied Biosystems®), PARP (Cf02630973_m1), HPRT1 (Hs01003267_m1), RPLPO (Hs04189669_m1). A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo $\Delta\Delta C_t$, que relaciona a média da expressão dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno e a média da expressão dos genes de interesse em cada amostra (LIVAK & SCHMITTGEN, 2008). O valor de RQ (quantificação relativa) do grupo controle (utilizado como referência) foi estabelecido como unidade para análise da expressão do gene PARP1.

3.8 Análise dos Resultados

A partir dos resultados da Imunofluorescência e do PCR, foram realizados o teste ANOVA e em seguida o teste de comparação múltipla de Bonferroni para avaliar estatisticamente, onde, valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes e todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* GraphPrism 5.0.

4 Resultados

4.1 Cultivo Celular

Na Figura 2 é demonstrada a cultura de células CF41 sem tratamento, onde pode-se observar a colônia de células fusiformes em crescimento apresentando um núcleo conspícuo, característico deste tipo de linhagem celular. Dessa forma, pode-se concluir que a etapa de crescimento celular foi realizada com sucesso.

Figura 2. Células controle da linhagem CF41 com confluência de aproximadamente 80%.

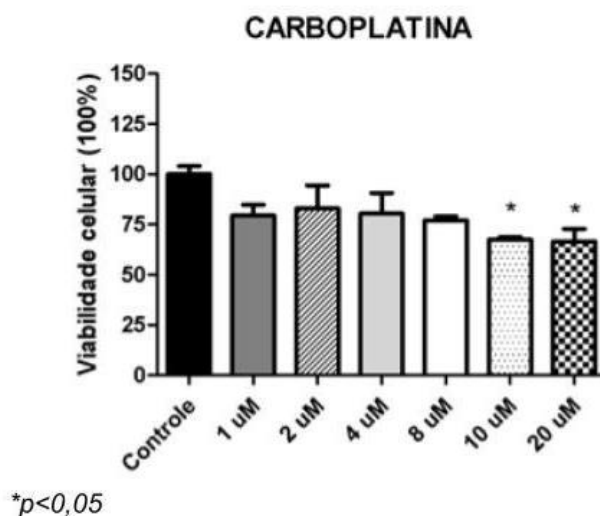


Fonte: Própria Autora.

4.2 Teste de Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular relativa (%) de cada amostra foi calculada a partir da média dos valores de absorbância das triplicatas. Para o valor obtido no grupo controle, foi atribuído 100% de viabilidade celular. Nos outros grupos os valores foram calculados a partir da diferença em relação ao grupo controle. Os resultados demonstraram que o tratamento com as concentrações de 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M e 8 μ M de Carboplatina não alterou a viabilidade das células da linhagem CF41 após 24 horas de tratamento. Apenas a concentração de 10 μ M e 20 μ M de Carboplatina diminuiu significativamente a viabilidade das células CF41 em relação às células controle. Sendo assim, utilizamos a concentração de 10 μ M que se mostrou eficiente para o nosso estudo.

Figura 3. Gráfico que representa a viabilidade celular pelo ensaio MTT na linhagem CF41 após 24 horas do tratamento com Carboplatina (1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M, 10 μ M e 20 μ M). Os dados são expressos como a porcentagem do grupo controle.



4.3 Tratamento Celular

No decorrer do cultivo e após as células apresentarem 80% de confluência, foi adicionada à Carboplatina em uma concentração de 10 µM. O tratamento foi trocado a cada 3 dias por cerca de 3 semanas. Assim, grande quantidade de células CF41 sofreram apoptose, restando apenas algumas células que por indução ao quimioterápico passaram a ficar resistentes, apresentando um aspecto mais alongado, sem forma definida e com um núcleo bem evidente. A figura 3 mostra o aspecto de células resistentes no decorrer do tratamento antes da morte celular após alguns dias.

A definição da dose de Olaparib foi feita por meio da IC₅₀, em que a concentração de 10µM se mostrou mais eficiente no tratamento após a indução da resistência.

Figura 4. Morfologia das células CF41 durante o tratamento e indução da quimiorresistência com 10 µM de Carboplatina.



Fonte: Própria Autora.

4.4 Imunofluorescência

Conforme o esperado, houve diminuição da expressão proteica do PARP1 após o tratamento com 10 μ M de Olaparib ($64,24 \pm 7,027$) comparado ao grupo controle ($94,70 \pm 6,725$) ($p < 0,05$; Tabela 1). Todos os dados da expressão proteica do PARP1 estão descritos na tabela abaixo e mostrados graficamente na figura 5. Já na figura 6, encontram-se fotomicrografias por imunofluorescência que comprovam a diminuição da expressão da PARP1.

Tabela 1. Dados da análise da expressão proteica do PARP1 por imunofluorescência expressos em média e $\pm$ desvio padrão.

<i>Grupo de Tratamento</i>	<i>Média $\pm$ Desvio Padrão</i>
<i>Controle</i>	<i>$94,70 \pm 6,725$</i>
<i>** Olaparib</i>	<i>$64,24 \pm 7,027$</i>
<i>Resistente</i>	<i>$92,45 \pm 7,856$</i>
<i>Resistente tratado com Olaparib</i>	<i>$68,25 \pm 7,106$</i>

** $p < 0,05$*

Figura 5. Média da Expressão Proteica da *PARP1* por imunofluorescência nas células da linhagem tumoral mamária canina CF41.

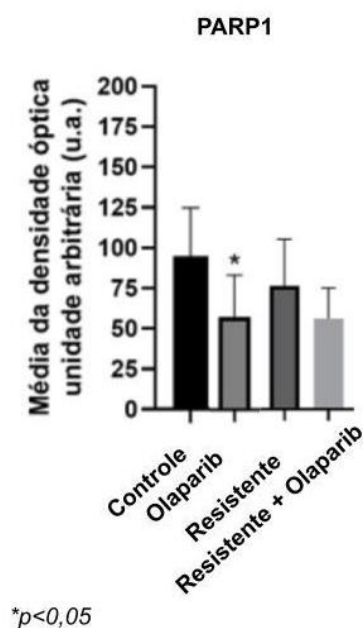
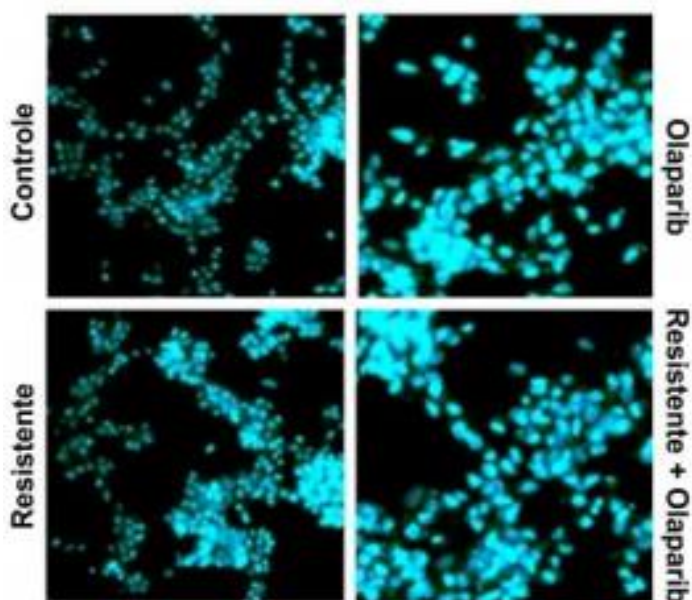


Figura 6. Fotomicrografias da Expressão Proteica da *PARP1* por imunofluorescência nas células da linhagem tumoral mamária canina CF41, comparando os grupos tratados com as células sem tratamento (controle) e grupo resistente com o grupo resistente tratado com Olaparib.



4.5 RT-PCR quantitativa (qPCR)

A análise da expressão gênica para as células da linhagem tumoral mamária CF41, apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa na expressão do PARP1 nas células

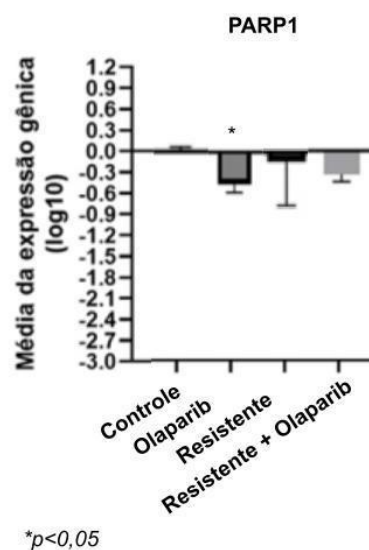
tratadas com Olaparib e Resistente com Olaparib quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$; Tabela 2). Todos os dados da expressão gênica do PARP1 estão descritos na tabela abaixo e mostrados graficamente na figura 7.

Tabela 2. Dados da análise da expressão gênica por qPCR, expressos em média $\pm$ desvio padrão.

<i>Grupo de Tratamento</i>	<i>Média $\pm$ Desvio Padrão</i>
<i>Controle</i>	$0 \pm 0,01583$
<i>Resistente</i>	$-0,08950 \pm 0,1721$
<i>*Olaparib</i>	$-0,3453 \pm 0,03768$
<i>Resistente + Olaparib</i>	$-0,2638 \pm 0,03423$

* $p < 0,05$

Figura 7. Média da Expressão Gênica da PARP1 por PCR em tempo real nas células da linhagem tumoral mamária canina CF41. Valores comparados com os grupos tratados com as células sem tratamento (controle) e grupo resistente com o grupo resistente tratado com Olaparib.



5 Discussão

A Carboplatina foi utilizada em nosso estudo pois é um medicamento conhecido e muito utilizado em estudos na área da oncologia humana (DAL LAGO *et al*, 2006). Apesar de serem

eficientes e muito utilizados nos tratamentos, os agentes quimioterápicos causam efeitos colaterais aos pacientes. Ainda, causam estresse oxidativo nas células as quais respondem ingressando em senescência celular, através de células tumorais progenitoras (ACHUTAN *et al*, 2011). Sendo assim, é de extrema importância considerar que agentes citotóxicos como os quimioterápicos, são grandes geradores de recidiva tumoral (TE POELE *et al*, 2002).

Ao utilizarmos o medicamento a base de sais de platina em nossa linhagem celular de cadela, observamos que os resultados comparados com o grupo controle e com os demais tratamentos utilizados, mostraram-se estatisticamente significativos. Isso se deve ao fato do medicamento ser indicado para tratamento de neoplasias mamárias malignas de caninos e felinos (LAVALLE *et al*, 2012). Embora os sais de platina como monoterapia sejam medicamentos mais ativos e eficazes no tratamento de câncer de mama metastático, as doses causam uma variedade de efeitos colaterais e são extremamente tóxicos para o organismo. Apesar dessa eficiência no tratamento, as células quiescentes que surgiram a partir de um grupo progenitor comum e que não sofreram apoptose (SCHÜRCH *et al.*, 2018) servem como uma reserva e levam à recorrência tumoral mais agressiva (ACHUTHAN *et al*, 2011; ZHENG *et al*, 2004) após períodos prolongados de tratamento (LIVRAGHI & GARBER, 2015).

Os resultados obtidos foram coerentes com as hipóteses da literatura (ABECASSIS, *et al.*, 2019; JARRAR *et al.*, 2019), pois a partir das análises da expressão proteica por imunofluorescência (Tabela 1 e Figuras. 5 e 6) e pela análise da expressão gênica por PCR em tempo real (Tabela 2 e Fig. 7), pode-se observar diminuição significativa na expressão de PARP1. O tratamento com 10 μ M de Olaparib por 24h, foi eficaz na redução da expressão gênica e proteica da PARP1 das células tratadas quando comparadas com o grupo controle. Essa estratégia inovadora é vista em alguns estudos com pacientes humanos (ARMENIA *et al*, 2018), onde os inibidores de PARP apresentam eficácia no tratamento de aproximadamente 60% dos pacientes com tumores de mama e/ou tumores de ovário (LI *et al*, 2020). Diante disso, esses métodos aplicados para tumores humanos devem ser adaptados para tratamentos de tumores caninos a fim de aumentar a sobrevida desses animais (FONSECA & DELECK, 2000). Embora o uso dos inibidores de PARP1 seja uma inovação terapêutica, ainda há dúvidas que precisam ser respondidas, uma vez que tratamentos contínuos e prolongados podem levar a uma grande toxicidade hematológica ou até desenvolvimento de outros tumores em humanos (LIVRAGHI & GARBER, 2015). Além

disso, alguns estudos mostram que alguns pacientes podem apresentar resistência ou até mesmo não apresentarem respostas aos inibidores de PARP (LI *et al*, 2020).

A diminuição significativa na expressão gênica não é apenas explicada pela atuação do Olaparib o qual, inibe a ação da PARP, mas também, pela ação da Carboplatina como agente alquilante (ALMEIDA *et al.*, 2005), isto é, adicionando grupos metil ou etil que interagem com as bases do DNA, acarretando em mudança na estrutura das bases e consequentemente um pareamento diferente do esperado. Essa metilação traz como um de seus resultados, a inibição/silenciamento da expressão de genes por meio da inibição direta ou indireta da ligação dos fatores de transcrição (NUSSBAUM, 2008).

Ainda, por meio do nosso estudo, foi possível demonstrar que a resistência realizada por meio da Carboplatina 10 μ M induziu a senescência de células tumorais. Vale ressaltar ainda, que apesar de termos demonstrado redução significativa das expressões gênica e proteica da PARP1 quando tratadas com Olaparib (10 μ M), ainda é necessário averiguar no futuro, por meio de um ensaio clonogênico, se a morte celular é eficiente nas células resistentes. Apesar disso, o nosso estudo é inovador, já que tratamentos para tumores mamários caninos são escassos, apresentando a cirurgia como o único método padrão efetivo (FONSECA & DALECK, 2000; DE CAMPOS *et al.*, 2018) para esses pacientes.

6 CONCLUSÃO

Logo, concluímos que a indução à resistência foi efetiva e que houve uma resposta na diminuição da expressão da proteína PARP nas células resistentes e não resistentes que receberam o tratamento com o 10 μ M de Olaparib, quando comparadas com o grupo controle. Dessa forma, os inibidores de PARP (Olaparib) podem ser efetivos para o tratamento neoadjuvante na medicina personalizada além de inibir a recidiva tumoral dos tumores de mama na espécie canina.

REFERÊNCIAS

ABECASSIS, I. *et al.* PARP1 rs1805407 Increases Sensitivity to PARP1 Inhibitors in Cancer Cells Suggesting an Improved Therapeutic Strategy. **Nature.**, v.9, n.1, p.3309, 2019.

ACHUTHAN, S. *et al.* Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. **J Biol Chem.**, v.286, n.43, p.37813-29, 2011.

ALMEIDA, V.L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ANDRADE, A.C.S.; BITTENCOURT, L.H.F.B. Castração convencional e precoce: Revisão de Literatura, 2013.

ARMENIA, J. *et al.* The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. **Nature genetics**, v. 50, n. 5, p. 645-651, 2018.

BENAFIF, S.; HALL, M. An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. **Onco Targets Ther.**, v.8, p.519-28, 2015.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. 2018.

CHERDYNTSEVA, N.V. *et al.* Circulating tumor cells in breast cancer: functional heterogeneity, pathogenetic and clinical aspects. **Exp Oncol.**, v.39, n.1, p.2-11, 2017.

DAL LAGO, L. *et al.* Tratamento Adjuvante do Câncer de Mama em Estágios Iniciais. **Rev. Bras. Oncologia Clínica**, v. 3, n. 7, p. 9-26, 2006.

DE CAMPOS, C.B. *et al.* Adjuvant Thalidomide and Metronomic Chemotherapy for the Treatment of Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms. **In Vivo.**, v.32, n.6, p.1659-1666, 2018.

DEY, P.; RATHOD, M.; DE, A. Targeting stem cells in the realm of drug-resistant breast cancer. **Breast Cancer (Dove Med Press).**, v.11, p.115-135, 2019.

FONSECA, C.S.; DALECK, C.R. Canine mammary tumors: hormonal influence and effects of ovarihiysterectomy as an adjuvant therapy. **Cienc. Rural.**, v.30, n.4, p.731-735, 2000.

HUSSAIN, S. *et al.* Gene expression profiling of spontaneously occurring canine mammary tumours: Insight into gene networks and pathways linked to cancer pathogenesis. **PLoS One.**, v.13, n.12, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Atlas da mortalidade. Rio de Janeiro: INCA, 2021. **Base de dados.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>. Acesso em 30 jan 2022.

JARRAR, A. *et al.* Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Sensitizes Colorectal Cancer-Initiating Cells to Chemotherapy. **Stem Cells.**, v.37, n.1, p. 42- 53, 2019.

KING, Martin Luther. **The Words of Martin Luther King.** Fount Paperbacks, 1985.

LAVALLE, G. E. *et al.* Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**, v. 26, n. 3, p. 375-379, 2012.

LEONEL, C. *et al.* Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis by Combined TGFbeta Knockdown and Metformin Treatment in a Canine Mammary Cancer Xenograft Model. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.**, v.22, n.1, p.27-41, 2017.

LI, H. *et al.* PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. **Molecular cancer**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2020.

LIVRAGHI, L.; GARBER, J.E. PARP inhibitors in the management of breast cancer: current data and future prospects. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 188, 2015.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

MARCONATO, L. *et al.* Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. **Cancers (Basel).**, v.11, n.2, 2019.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. **Cell.**, v.168, n.4, p.613-628, 2017.

MEDEIROS, V.B. Mammary cancer in female dogs. **Journal of surgical and Clinical research**, v. 8, n. 1, p. 118-129, 2017.

GONZÁLEZ-MONTOYA, M. *et al.* Peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. **Food chemistry**, v. 242, p. 75-82, 2018.

NUSSBAUM, R. **Thompson & Thompson genética médica**. 8ed, Elsevier Brasil, p. 69-70, 2008.

OSAKI, T. *et al.* Establishment of a canine mammary gland tumor cell line and characterization of its miRNA expression. **J Vet Sci.**, v.17, n.3, p. 385-390, 2016.

PAN, H. *et al.* 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. **N Engl J Med.**, v.377, n.19, p.1836-1846, 2017.

PRASAD, R. *et al.* Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** n.19, p.30071-72019, 2019.

QUAYLE, L.A.; OTTEWELL, P.D.; HOLEN, I. Chemotherapy resistance and stemness in mitotically quiescent human breast cancer cells identified by fluorescent dye retention. **Clinical & experimental metastasis**, v. 35, n. 8, p. 831-846, 2018.

ROLDÁN-ARJONA, T., ARIZA, R.R. DNA Demethylation. **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6365/>

SCHÜRCH, C.M. *et al.* Tumor Heterogeneity in Lymphomas: A Different Breed. **Pathobiology.**, v.85, n.1-2, p.130- 145, 2018.

SONREMO, K.U, *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Vet Pathol.**, v. 48, n.1, p.85-97, 2011.

TE POELE, R.H. *et al.* DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer research**, v. 62, n. 6, p. 1876-1883, 2002.

TODEN, S. *et al.* Cancer stem cell-associated miRNAs serve as prognostic biomarkers in colorectal cancer. **JCI Insight.**, v.4, n.6, 2019.

XAVIER, P.L.P. *et al.* ZEB1 and ZEB2 transcription factors are potential therapeutic targets of canine mammary cancer cells. **Veterinary and comparative oncology**, v. 16, n. 4, p. 596-605, 2018.

YANG, Z. *et al.* Disulfiram modulates ROS accumulation and overcomes synergistically cisplatin resistance in breast cancer cell lines. **Biomed Pharmacother.**, v.113, p. 108727, 2019.

ZHENG, X. *et al.* Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. **Cancer research**, v. 64, n. 5, p. 1773-1780, 2004.

ANEXO A – Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – FAMERP)



CEUA
Comissão de Ética no
Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



LICENÇA CEUA 04/2017

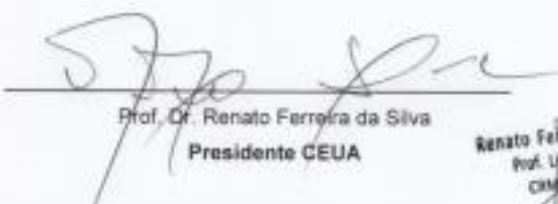
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO DE PROJETO APROVADO
(DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO TÉCNICA CONCEA Nº 08 DE 18 DE MARÇO DE 2016)

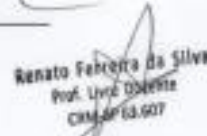
Certificamos que a proposta intitulada “**Marcadores tumorais em biópsia líquida- Estudo dos mecanismos de resistência por bloqueio do reparo do DNA- Análise comparativa**”, protocolo FAMERP nº **001-003673/2017**, em 04 de Setembro de 2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, que envolve a produção/ manutenção/utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FAMERP (CEUA-FAMERP) em reunião de 27 de Setembro de 2017.

FINALIDADE	Pesquisa
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	10/10/2017 a 10/10/2019
ESPÉCIE	Canina
NÚMERO DE ANIMAIS	40
PESQUIDADE	Diversos
SEXO	Fêmeas
ORIGEM	Das coletas das amostras de sangue e biópsia tumoral

São José do Rio Preto, 04 de Outubro de 2017.



Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva
Presidente CEUA



Renato Ferreira da Silva
Prof. Univ. Osório
CRM 40163/607

(Portaria FAMERP 109, de 28 de outubro de 2014 – DOESP de 05 de novembro de 2014, Poder Executivo – Seção I, 124(209) – 57)

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro. CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto – SP – Brasil
Tel. (17) 3201-5936

**ANEXO B – Certificado de Participação e Apresentação de trabalho no XXXII
Congresso de Iniciação Científica da Unesp**

Verifique o código de autenticidade 2042093.0550112.013030.8.04209305501120130308 em <https://www.even3.com.br/documentos>

 **PROPE**
PRÓ-REITORIA
DE PESQUISA

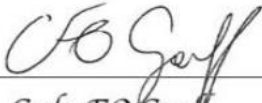
 **unesp**
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

 **XXXII** Congresso de Iniciação
Científica da Unesp

CERTIFICADO

Certificamos que **Gabriela Karam Rebolho**, participou das atividades previstas na Programação da 1ª Fase do XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp realizada nos dias 20, 21 e 22 de outubro de 2020, apresentando o trabalho intitulado "Indução da quimiorresistência em células da linhagem de câncer de mama canino CF41 e sua relação com a PARP e seu inibidor". A carga horária total do evento é de 24 horas.

São Paulo, 22 de outubro de 2020.



Carlos F.O. Graeff
Pró-Reitor de Pesquisa da UNESP

**ANEXO C – Classificação da 1ª fase da Apresentação de Trabalhos no XXXII
Congresso de Iniciação Científica da Unesp**

ID	CPF do Aluno	Curso de Graduação	Média	Classificação 1ª Fase
281560	466.959.948-89	Letras	10,00	1
288216	448.912.008-71	Ciências Biológicas	9,92	2
280790	442.413.108-42	Ciências Biológicas	9,92	3
283115	439.753.458-61	Física Biológica	9,92	4
282504	457.175.688-78	Letras	9,92	5
287749	439.202.358-35	Letras	9,92	6
284957	492.407.848-45	Letras	9,92	7
286226	471.011.208-81	Ciência da Computação	9,83	8
283464	401.440.648-20	Ciências Biológicas	9,83	9
281315	444.382.728-58	Engenharia de Alimentos	9,83	10
287770	430.076.268-62	Matemática	9,83	11
287970	483.685.818-69	Química Ambiental	9,83	12
284512	358.617.848-41	Ciência da Computação	9,75	13
285627	050.855.491-80	Ciências Biológicas	9,75	14
285454	227.337.658-84	Engenharia de Alimentos	9,75	15
286931	421.868.608-48	Engenharia de Alimentos	9,75	16
285153	435.882.748-98	Letras	9,75	17
282923	476.831.018-42	Letras	9,75	18
283609	442.199.428-66	Letras	9,75	19
285607	484.983.328-42	Química Ambiental	9,75	20
286784	484.726.998-54	Ciências Biológicas	9,67	21
281977	466.121.648-24	Física Biológica	9,67	22
288369	475.577.008-48	Letras	9,67	23
284184	363.352.838-59	Letras	9,67	24
283459	402.364.108-14	Pedagogia	9,67	25
283829	507.936.688-59	Química Ambiental	9,67	26
284425	455.143.548-14	Ciência da Computação	9,58	27
287329	421.020.158-82	Ciência da Computação	9,58	28
287272	469.939.468-07	Ciências Biológicas	9,58	29
287234	437.101.478-08	Letras	9,58	30

**Trabalho classificado em 29º lugar(grifado)*

ANEXO D – Certificados de Apresentação de trabalho no VII CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e V Congresso Científico FAMERP/FUNFARME

Declaração de Apresentação de Trabalho

Declaro que **GABRIELA KARAM REBOLHO, MARINA GOBBE MOSCHETTA, JUCIMARA COLOMBO, DEBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI**, apresentaram o trabalho intitulado: **INDUÇÃO DA QUIMIORRESISTENCIA EM CELULAS DA LINHAGEM DE CANCER DE MAMA CANINO CF41 E SUA RELAÇÃO COM A PARP E SEU INIBIDOR**, durante o XVII CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e V Congresso Científico FAMERP/FUNFARME, realizado em 21 de outubro de 2020, no Google Meet.

Profa. Dra. Lucia Marinilza Beccaria
Presidente do Evento

Profa. Dra. Suzana Margareth Ajeje Lobo
Diretora Adjunta de Pesquisa

Documento emitido no dia 5 de janeiro de 2022.

Código de validação: **72AF-DC2F-9AD9-404A-9C96**

A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da FAMERP
<http://verifdoc.famerp.br/Validar.aspx>

**ANEXO E – Certificado de Participação do VII Internacional Symposium on
Translational Oncology**



CERTIFICATE

Certificamos que

GABRIELA KARAM REBOLHO

participated in the VII International Symposium on Translational
Oncology, held in Barretos, Brazil, from September 13th to 14th,
2019.

Workload: 21h40min

We appreciate your attendance and active participation.

Barretos, September 14, 2019


Rui Manuel Reis, PhD
Molecular Oncology Research Center

<http://oncoeventos.com.br/validador/468b084119a1c7a4950f00706ec7ea164426>