

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA RAPAMICINA SOBRE CÉLULAS DE TUMORES DE
MAMA CANINO PRIMÁRIO E METASTÁTICO CULTIVADAS *IN*
*VITRO***

PATRÍCIA DE FARIA LAINETTI

Botucatu – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA RAPAMICINA SOBRE CÉLULAS DE TUMORES DE
MAMA CANINO PRIMÁRIO E METASTÁTICO CULTIVADAS *IN*
*VITRO***

PATRÍCIA DE FARIA LAINETTI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia Animal
da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre

Orientadora: Dra. Fabiana Ferreira de
Souza

Coorientador: Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Botucatu – SP

Junho 2019

Nome do autor (a): Patrícia de Faria Lainetti

Título: Efeitos da rapamicina sobre células de tumores de mama canino primário e metastático cultivadas *in vitro*

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -
Botucatu /SP

Prof. Dr. Renée Laufer Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária – Setor de Patologia - FMVZ UNESP -
Botucatu /SP

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Membro

Departamento de Morfologia IBB - UNESP - Botucatu /SP

Data da Defesa: 25 de junho de 2019.

Dedico aos meus pais (Paulo Ernesto de Oliveira Lainetti e Elizabeth Brigagão de Faria Lainetti), à minha irmã (Fabiana de Faria Lainetti) e ao meu amor (Antonio Fernando Leis Filho), que sempre me apoiaram e incentivaram de forma incondicional.

Agradecimentos

Agradeço a minha família pelo apoio incondicional e todo esforço que realizaram para eu chegar até onde estou. Sem eles nada disso seria possível. Obrigada por sempre me colocarem em primeiro lugar e de transformarem os meus sonhos nos nossos sonhos. Paulo, Elizabeth e Fabiana, vocês são meus exemplos.

Ao meu amado e paciente companheiro de jornada, Antonio Fernando Leis Filho. Obrigada por todo o apoio nesses anos que passamos juntos e por sempre me fazer ver a vida de uma forma mais leve e divertida. Sem você esse momento estaria incompleto.

À Professora Fabiana Ferreira de Souza pela orientação, paciência e amizade. Obrigada por apoiar minhas escolhas e pelo suporte durante esses anos. Tenho muito respeito e admiração pela professora e pessoa que você é.

Ao Carlos Eduardo Fonseca Alves pela coorientação e por sempre me acalmar, mostrando que as coisas são mais simples do que parecem. Obrigada pelo voto de confiança, por todos os ensinamentos e oportunidades que me foram oferecidas.

À Priscila Emiko Kobayashi pelos vários momentos divertidos, pela paciência e por dividir o seu conhecimento.

À Professoras Renée e Flávia pelo apoio na realização desse projeto e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Ao Márcio Carvalho, por toda ajuda no laboratório, sempre com muita boa vontade.

Aos amigos que, de perto ou de longe, foram essenciais para os momentos de descontração e boas risadas.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Ao financiamento do presente trabalho, realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"No quiero que pienses como yo, sólo que pienses."

Frida Kahlo

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	ii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Tumores mamários.....	2
2.2 Sinais clínicos e diagnóstico.....	5
2.3 Classificação histopatológica dos tumores mamários.....	6
2.4 Metástases	8
2.5 Estadiamento e fatores prognósticos	10
2.6 Tratamento	13
2.7 Cultivo celular	16
2.8 Oncogenes	17
2.9 Via PI3K-AKT-mTOR.....	18
2.10 Rapamicina.....	19
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2	1
ARTIGO I.....	33
Resumo	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAIS E MÉTODOS	36
2.1 Reagentes	36
2.2 Comitê de Ética	36
2.3 Design Experimental.....	36
2.4 Aquisição das amostras de carcinoma mamário	36
2.4.1 Análise histológica	37
2.4.3 Imunofluorescência	38
2.5 Cultivo celular	40
2.5.1 Estabelecimento de cultivo celular.....	40

2.5.2 Fenótipo celular.....	41
2.5.3 Morfologia celular.....	42
2.5.4 qPCR.....	43
2.5.5 Tratamento com rapamicina e avaliação da atividade metabólica celular	44
2.6 Análise estatística.....	44
3 <i>RESULTADOS</i>	45
3.1 Tecido de carcinoma mamário	45
3.2 Cultivo celular	46
3.2.1 qPCR.....	46
3.2.2 Avaliação da atividade metabólica celular	47
4 <i>DISCUSSÃO</i>	48
5 <i>CONCLUSÃO</i>	51
<i>REFERÊNCIAS</i>	52

RESUMO

LAINETTI, P.F. EFEITOS DA RAPAMICINA SOBRE CÉLULAS DE TUMORES DE MAMA CANINO PRIMÁRIO E METASTÁTICO CULTIVADAS *IN VITRO*, Botucatu – SP. 2018. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP.

As neoplasias estão se tornando cada vez mais comuns entre os animais domésticos, seja devido a maior expectativa de vida ou pelo avanço dos métodos diagnósticos e tratamentos. As neoplasias mamárias são o tipo mais comum de neoplasias entre as fêmeas caninas. A procura por novos tratamentos e/ou tratamentos específicos para os animais é cada vez mais comum frente a esse quadro. A rapamicina é um fármaco antifúngico com atividade antitumoral, que atua inibindo o complexo *mTOR*, já testada para o tratamento de neoplasias em diferentes órgãos em humanos, podendo ser uma alternativa no tratamento de neoplasias em cães. Devido ao grande número de repetições que os ensaios com fármacos necessitam, o cultivo celular *in vitro* é uma alternativa inicial para a descoberta de novos medicamentos eficazes no tratamento dessa espécie, além de também se tornar um ensaio pré-clínico. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da rapamicina em células de tumores mamários primários e suas respectivas metástases de cadelas, cultivadas *in vitro*. Foram utilizados dois tipos histológicos tumores de mama, provenientes do tumor primário e suas respectivas metástases. Após a colheita, as amostras foram classificadas por histopatologia como carcinoma sólido grau III e carcinoma adenoescamoso, como tumores triplo negativos não basal pela imuno-histoquímica e tanto os tumores primários como suas metástases apresentaram expressão positiva para as proteínas *PTEN*, *AKT*, *mTOR* e *4EBP1* na imunofluorescência. Parte do tecido tumoral foi cultivado *in vitro* e as células foram avaliadas quanto a morfologia e fenótipo celular, expressão gênica (qPCR) e viabilidade celular (MTT). Os genes validados pela qPCR foram *AKT*, *mTOR* e *PTEN*, relacionados com a via *AKT-mTOR*. A expressão do gene *PTEN* estava diminuída e do *mTOR* aumentada nas células de tumores primários, quando comparadas as suas metástases. O tratamento com rapamicina e ensaio MTT foram

realizados nas concentrações de 2, 5, 10 e 12 μM , por 24, 48 e 72 h. O ensaio de MTT mostrou que para uma diminuição de 50% da viabilidade celular, a concentração de rapamicina deve ser 2 μM para o carcinoma adenoescamoso e 10 μM para metástase. Para o carcinoma sólido grau III e sua respectiva metástase, a concentração utilizada foi de 12 μM . A rapamicina teve um resultado satisfatório na inibição do crescimento dos dois tipos celulares utilizados nesse estudo.

Palavras-chave: cão, carcinoma mamário, cultivo celular, neoplasia

ABSTRACT

LAINETTI, P.F. EFFECTS OF RAPAMYCIN IN CANINE PRIMARY AND METASTATIC MAMMARY TUMOR CELLS CULTIVATED *IN VITRO*, Botucatu – SP. 2018. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP.

Neoplasms are becoming increasingly common among animals, whether due to longer life expectancy or new diagnostic methods and treatments. Breast neoplasms are the most common type of neoplasm among canine females. The search for new treatments and / or specific treatments for animals is increasingly common in this context. Rapamycin is an antifungal drug with antitumor activity, which acts to inhibit the mTOR complex. It was already tested for the treatment of neoplasms in different organs in humans and may be an alternative in the treatment of neoplasms in dogs. Due to the large number of replicates required by drug assays, in vitro cell culture is an early alternative for the discovery of new drugs that might be effective in treatment of this species, as well as becoming a preclinical assay. The aim of this study was to evaluate the effect of rapamycin on primary and metastatic mammary dog tumor on in vitro cultured cells. Two histological types of neoplastic cells from the primary tumor and their respective metastases were used. After collection, the samples were classified by histopathology as grade III solid carcinoma and adenosquamous carcinoma, as non-basal triple negative tumors by immunohistochemistry, and both the primary tumors and their metastases presented positive expression for PTEN, AKT, mTOR and 4EBP1 proteins in immunofluorescence. A fragment of the tumor tissue was cultured in vitro and the cells were evaluated for cell morphology and phenotype, gene expression (qPCR) and cell viability (MTT). The genes validated by qPCR were AKT, mTOR and PTEN, related to the AKT-mTOR pathway. PTEN gene expression was decreased and mTOR increased in primary tumor cells when compared to metastatic tumors. Treatment with rapamycin and MTT assay were performed at concentrations of 2, 5, 10 and 12 μ M for 24, 48 and 72 h. The MTT

assay showed that for a 50% decrease in cell viability, the concentration of rapamycin should be 2 μM for adenosquamous carcinoma and 10 μM for its metastasis. For grade III solid carcinoma and its respective metastasis, the concentration used was 12 μM . The treatment with rapamicyn inhibited the cell growth in the two cell types cultured *in vitro*.

Keywords: female dog, breast carcinoma, cell culture, neoplasm

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Em fêmeas caninas, as neoplasias mamárias são o tipo mais comum de tumores, correspondendo cerca de aproximadamente 50% dos casos diagnosticados. Dentre esses, aproximadamente metade são tumores malignos (BONNETT et al., 1997; DALECK et al., 1998; DE NARDI et al., 2002; DOBSON et al., 2002; SORENMO, 2003). Considerando as neoplasias malignas, a mais comum é o carcinoma (subtipo simples) e as benignas, o adenoma mamário (BONNETT et al., 1997; DOBSON et al., 2002). Cerca de 30% das cadelas com tumores malignos apresentam metástases em linfonodos (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

Em humanos, a neoplasia mamária também é considerada o tipo mais comum dentre os tumores malignos, sendo o carcinoma ductal invasivo, o tipo mais diagnosticado. Além disso, as neoplasias mamárias malignas são a maior causa da alta incidência de mortalidade entre mulheres. Por esses motivos, a prevenção e novas terapias são essenciais para o bom prognóstico (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018). O uso de amostras de tumores humanos na pesquisa ainda é controverso pelas questões éticas e, cada vez mais, são utilizados modelos experimentais (MACEWEN, 1990; GHONCHEH; POURNAMDAR; SALEHINIYA, 2016). Desta maneira, amostras de tumores de diferentes espécies e com ocorrência espontânea de tumores mamários podem ser utilizadas para o estudo de novas alternativas terapêuticas, assim como modelos *in vitro*.

Os tumores mamários das cadelas possuem similaridades com os tumores em mulheres, como o fato de ocorrerem de forma espontânea, geralmente surgirem em animais e mulheres com idade avançada. O curso da doença, os estádios clínicos, a invasão dos linfonodos e os marcadores moleculares importantes na carcinogênese, são características semelhantes nas duas espécies (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018). Ademais, as proteínas envolvidas na carcinogênese atuam de forma semelhante nas neoplasias mamárias humanas e caninas (KLOPFLEISCH et al., 2010), além de ambas as espécies serem expostas aos mesmos agentes carcinógenos, uma vez que vivem no mesmo ambiente e os fatores de risco e mudanças moleculares são semelhantes. Outro exemplo dessa relação entre humanos e cães, são os diferentes tipos de neoplasias encontrados

em ambas as espécies, como linfoma, carcinoma de pulmão e osteossarcoma (YU; CHEAH, 2017). Devido à essas semelhanças, é possível extrapolar os tratamentos já estudados em humanos para a espécie canina, já que há uma limitação de estudos sobre o tema, devido à falta de fármacos e/ou desenvolvidos especificamente para a espécie.

Para realizar estudos em larga escala envolvendo o desenvolvimento e comportamento tumoral, expressão gênica e proteica, além de diferentes formas de tratamento, é necessário uma maior quantidade de amostras. Atualmente, os estudos da expressão gênica global ocorrem em tecidos mamários congelados ou de fragmentos histológicos e não em células cultivadas *in vitro* (KLOPFLEISCH et al., 2010^a; PUCCI-MINAFRA et al., 2017). O cultivo de células tumorais *in vitro* se tornou uma alternativa ao modelo *in vivo*, o qual permite maior reprodutibilidade dos resultados devido a homogeneidade da população celular. Tais modelos permitem testes de toxicidade de fármacos de forma econômica e os resultados podem ser uma prévia do que se espera *in vivo* (BUTLER, 2004).

As células de tumores de mama em humanos possuem maior expressão do complexo *mTOR* devido a mutações dos oncogêneses ou pela perda da função dos genes supressores. Assim, fármacos inibidores dessa via estão sendo estudados para o tratamento de neoplasias em diferentes órgãos, como a rapamicina, um antifúngico com capacidade imunossupressora e antiproliferativa de células de mamíferos, atuando especificamente como inibidor do complexo *mTOR* (LI; KIM; BLENIS, 2014). Então, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da rapamicina sobre expressão gênica, proliferação e migração celular de células caninas de tumores mamários de cadelas, primários e suas metástases, cultivadas *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tumores mamários

O aumento da expectativa de vida dos animais domésticos está intimamente relacionado com a maior incidência de doenças de indivíduos de idade avançada, como as neoplasias (MORRISON, 1998). Apesar disso, novos métodos de

diagnósticos e diferentes tipos de tratamentos, que antes eram pouco conhecidos ou até mesmo inexistentes, tem contribuído para a maior longevidade destes animais.

O câncer é a segunda causa mais comum de óbitos nos animais de companhia. Contudo, em animais idosos, essa enfermidade é considerada a principal razão da alta incidência de mortalidade (BONNETT et al., 1997; PROSCHOWSKY et al., 2003; BENTUBO et al., 2007; TRAPP et al., 2010). Os tipos de tumores mais comuns nesta espécie e em fêmeas são as neoplasias cutâneas, de tecidos moles e na glândula mamária (DOBSON et al., 2002; GRÜNTZIG et al., 2016).

Em fêmeas não castradas ou castradas tardiamente, os tumores de mama são o principal local das neoplasias, correspondendo a 50% do total de tumores diagnosticados nas fêmeas. São mais comuns em cadelas idosas, acima de 7 anos, e com histórico de pseudociese (FONSECA; DALECK, 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Em países onde a ovariário-histerectomia é realizada em animais jovens, os níveis da enfermidade diminuíram consideravelmente (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011). Mais de 50% das neoplasias mamárias diagnosticadas são consideradas malignas (SLEECKX et al., 2011; PEÑA et al., 2014). Dentre as neoplasias malignas, a mais comum observada é o carcinoma, de subtipo simples, e das benignas, o adenoma (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

Normalmente as cadelas possuem 5 pares de mamas, que são divididos pelas suas localizações, sendo dois de mamas torácicas (M1 - mama torácica cranial e M2 - mama torácica caudal), dois de mamas abdominais (M3 - mama abdominal cranial e M4 - mama abdominal caudal) e um par de mamas inguinais (M5). As mamas abdominais caudais e inguinais são as mais acometidas pelas neoplasias mamárias, em vista da maior quantidade de tecido mamário nesses locais (DALECK; DE NARDI, 2016; CASSALI et al., 2017).

A glândula mamária é uma glândula sudorípara apócrina modificada, encontrada apenas em mamíferos. É composta por uma rede de ductos sustentados por um estroma fibrovascular, rico em adipócitos (SORENMO et al., 2011). O crescimento da glândula mamária é controlado pelos hormônios esteroides e,

alguns tumores mamários podem ser hormônio-dependentes (PEÑA, et al., 2014). Na puberdade, o estrógeno estimula o crescimento ductal e a progesterona dos lóbulos alveolares das glândulas mamárias, gerando uma hiperplasia de células secretoras e mioepiteliais (QUEIROGA et al., 2005; SLEECKX et al., 2011). Durante a gestação da cadela, a prolactina também estimula a proliferação do tecido mamário, a produção e a secreção láctea (QUEIROGA, et al., 2005).

As cadelas possuem maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasias mamárias, quando comparadas aos machos (DE NARDI et al., 2002), o que pode estar relacionado à ação dos hormônios estrógeno e progesterona durante o ciclo estral (SORENMO, 2003), porém as neoplasias também podem acometer os machos (DE NARDI et al., 2002). A exposição contínua e repetida aos hormônios esteroides, devido ao ciclo estral, principalmente o estrógeno, pode levar à formação de tumores mamários, pela frequente estimulação à proliferação do epitélio mamário (FONSECA; DALECK, 2000; SORENMO et al., 2000; QUEIROGA et al., 2005). Ademais, os hormônios esteroides são promotores de células tumorais iniciadas e regulam a transcrição de proto-oncogenes nucleares, auxiliando assim na formação de tumores, malignos ou benignos (SONREMO, 2003).

O efeito dos hormônios esteroides é mediado pelos receptores de estrógeno (ER) e os de progesterona (PR), que estão presentes tanto no tecido mamário normal como nos tumores. No entanto, os ER são mais expressos em neoplasias benignas, provavelmente pelo fato de serem tipos tumorais mais diferenciados histologicamente (MacEWEN et al., 1982; GUTTEMAN et al., 1988; PEÑA et al., 2014). Em humanos, o ER é considerado um marcador importante, utilizado para o prognóstico e tratamento de tumores de mama, já que os tumores ER positivos se beneficiam com a terapia endócrina coadjuvante à quimioterapia, quando comparados aos tumores ER negativos (HAMMOND et al., 2010). Contudo, esse tipo de avaliação não é comum na rotina diagnóstica veterinária e ainda há poucos estudos com resultados conclusivos relacionados com esses receptores, fato que pode comprometer a avaliação e o prognóstico do médico veterinário em relação ao paciente (PEÑA et al., 2014).

2.2 Sinais clínicos e diagnóstico

O diagnóstico dos tumores mamários é baseado na anamnese, exame físico geral e palpação minuciosa das glândulas mamárias. Geralmente, os animais que apresentam a neoplasia são idosos e não possuem alterações sistêmicas, ou seja, aparentemente encontram-se saudáveis, com exceção dos casos mais avançados da doença e de carcinomas inflamatórios (SORENMO et al., 2011).

Os tumores mamários podem se manifestar com aspectos distintos, como diferentes formatos (nodulares únicos ou múltiplos, ou em placas), tamanhos variados (a depender da evolução), consistência firme ou macia, móveis ou aderidos à pele e/ou à musculatura. Também podem estar ulcerados, acompanhados de inflamação e infecção local (CASSALI et al., 2017).

Após o diagnóstico clínico, o animal deve ser encaminhado para o exame de citologia aspirativa do tumor. É um exame que deve ser utilizado para diferenciar neoplasias mamárias de outros tipos de neoplasias, de algum tipo de inflamação ou hiperplasia da glândula mamária (SIMEONOV; STOIKOV, 2006).

A citologia não deve ser utilizada como método diagnóstico definitivo, pois em certas circunstâncias, como ausência de fatores evidentes de malignidade ou perante um quadro inflamatório das mamas, não é conclusivo (REIS et al., 2010). É um teste pouco sensível, porém específico, que pode ser utilizado como um teste de triagem para as neoplasias mamárias (ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001). O diagnóstico definitivo é realizado pelo exame histopatológico do tumor, pela técnica de biópsia ou após sua excisão cirúrgica (SIMEONOV; STOIKOV, 2006) em que há uma análise do material para identificar as características dos tecidos e alterações tumorais. Uma característica importante do exame é a possibilidade de predizer o grau de malignidade do tumor pela sua aparência morfológica, tamanho, taxa de proliferação e presença ou ausência de metástases (ELSTON; ELLIS, 1998; PAGE et al., 1998; PEÑA et al., 2014).

Os exames complementares são essenciais para o paciente oncológico, já que os animais com tumores podem apresentar alterações hematológicas, como coagulopatias, leucopenia ou leucocitose, síndromes paraneoplásicas e síndrome da coagulação intravascular disseminada (CHILDRESS, 2012). A averiguação da

função renal e hepática também deve ser realizada e, associada com os outros exames, possa determinar o estado geral do paciente, no momento do atendimento e anterior a indicação do tratamento (CASSALI et al., 2017).

A avaliação dos linfonodos regionais é de extrema importância, uma vez que podem ser o primeiro órgão com metástases nos animais acometidos por tumores de mamas. A citologia aspirativa, nesses casos, é o método mais seguro para o diagnóstico e deve ser realizada quando há alteração do volume, formato ou consistência do linfonodo (CASSALI et al., 2017).

As metástases distantes também devem ser investigadas e as mais frequentes são encontradas no pulmão e tecidos moles. Por este motivo, indica-se a avaliação do tórax por imagem radiográfica e dos tecidos moles pela ultrassonografia (RIBAS et al., 2012).

2.3 Classificação histopatológica dos tumores mamários

Os tumores são classificados pela sua composição histológica, podendo ser de origem epitelial, mesenquimal ou ambas. As células epiteliais são provenientes da ectoderma e as mesenquimais, da endoderma (SORENMO et al., 2011). As células epiteliais dão origem à epiderme, incluindo unhas e cabelo, e a glândulas subcutâneas e mamárias (SADLER, 2016). Assim, os tumores de mama mais frequentemente encontrados são os de origem epitelial, contudo, alguns casos são classificados como tumores mistos, com presença de tecido epitelial e mioepitelial, com áreas de cartilagem e/ou osso (SORENMO, 2003; GOLDSCHIMIDT et al., 2011).

A classificação histológica proposta por Goldschmidt et al. (2011) divide os tumores malignos e benignos. Os tumores malignos são classificados em epiteliais malignas, tipos especiais de epiteliais malignas, mesenquimais malignas (sarcomas), carcinosarcoma (tumor mamário maligno) e neoplasias de mamilo. Os tumores benignos são divididos em neoplasias benignas, hiperplasia/displasia mamária e de mamilo, como pode ser observado no Quadro 1.

Os critérios de malignidade são definidos pela classificação histológica do tumor, pleomorfismo nuclear e celular, contagem de figuras de mitoses e

porcentagem de formação tubular. Baseado nesses parâmetros, os tumores são classificados em grau I, II ou III de malignidade.

Quadro 1. Características dos tumores malignos e benignos mamários encontrados nas cadelas segundo Goldschmidt et al. (2011)

Tipo		Classificação
BENIGNAS	Neoplasias benignas	Adenomas simples, adenoma papilar intraductal, adenoma ductal, fibroadenoma, mioepitelioma, adenoma complexo (adenomioepitelioma), tumor benigno misto
	Hiperplasia/displasia de mamilo	Melanoses de pele do mamilo
	Hiperplasia/displasia mamária	Ectasias ductais, hiperplasia lobular ou adenose (podendo ser regular, com atividade secretora, com fibrose interlobular ou com atipia), as epitoliões, papilomatoses, alterações fibroadenomatosas e ginecomastia
MALIGNAS	Epiteliais malignas	Carcinoma <i>in situ</i> , carcinoma simples (tubular, tubulopapilar, papilar-cístico, cribiforme), carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma sólido, comedocarcinoma, carcinoma anaplásico, carcinoma e adenoma complexo, carcinoma tipo complexo (componente epitelial maligno e mioepitelial benigno), carcinoma e mioepitelioma maligno (componentes epitelial e mioepitelial malignos) e carcinoma misto (componente epitelial maligno e mioepitelial-mesenquimal benigno, com a parte mesenquimal composta por cartilagem ou osso), carcinoma ductal (parte maligna do adenoma ductal) e carcinoma papilar intraductal (parte maligna do adenoma papilar intraductal)
	Tipos especiais de epiteliais malignas	Carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma mucinoso, carcinoma rico em lipídios, carcinoma espinocelular (mioepitelioma maligno, carcinoma de células escamosas com variação espinocelular, carcinoma com variação espinocelular) e carcinoma inflamatório
	Mesenquimais malignas	Osteossarcomas, condrossarcomas, fibrossarcomas, hemangiossarcomas e outros tipos de sarcomas
	Carcinossarcoma (tumor mamário maligno)	Composto por células que se assemelham morfológicamente ao componente epitelial e a elementos do tecido conjuntivo do tecido mamário, ambos malignos
	Neoplasias de mamilo	Adenomas, carcinomas ou carcinomas com infiltração epidermal

Tumores classificados como grau I são bem diferenciados e manifestam

menor malignidade, quando comparados aos tumores de grau II, que são moderadamente diferenciados e a malignidade é considerada intermediária. Os tumores grau III são pouco diferenciados e possuem alta malignidade (ALENZA et al., 1997; MISDORP, 2002; GOLDSCHIMIDT et al., 2011). Os tumores mamários benignos, mesmo apresentando um prognóstico favorável, quando comparados aos tumores mamários malignos, podem progredir para uma neoplasia maligna (SORENMO et al., 2009).

2.4 Metástases

As metástases dos carcinomas mamários costumam ser difundidas pelos vasos linfáticos, forma mais comum, e pelos vasos sanguíneos, após a infiltração das células neoplásicas nos vasos linfáticos ou sanguíneos (SORENMO et al., 2011).

Os vasos linfáticos provenientes das mamas torácicas têm a drenagem guiada para os linfonodos axilares e as mamas inguinais, para os linfonodos inguinais (Figura 1). Geralmente essa drenagem ocorre dessa forma, contudo as mamas torácicas podem ter sua drenagem para os linfonodos inguinais e as mamas inguinais para os linfonodos axilares (SISSON, 1981).

O padrão de drenagem linfática das glândulas mamárias acometidas por tumores difere daquele das glândulas saudáveis. A neovascularização, que ocorre durante a formação do tumor, altera alguns vasos linfáticos inativos, que se tornam ativos, modificando o sistema de drenagem linfática (PATSIKAS et al., 2006).

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo a receber a drenagem das células tumorais, sua identificação é de extrema importância para ajudar a definir o prognóstico correto da neoplasia e são o principal local de metástases regionais (GIULIANO et al., 1994, SLEECKX et al., 2011).

Outro mecanismo que auxilia no entendimento das metástases distantes é a transição epitelial-mesenquimal, quando uma célula epitelial se transforma temporariamente em uma célula mesenquimal, para adquirir a capacidade de invadir a matriz extracelular (MEC). Ou seja, há mudança do fenótipo celular das células epiteliais, permitindo que elas possam se desvincular da estrutura daquele

tecido. A mudança celular ocorre por modificações de proteínas e eventos transcrpcionais em resposta à estímulos extracelulares, podendo ser reversível ou não (HUGO et al., 2007).

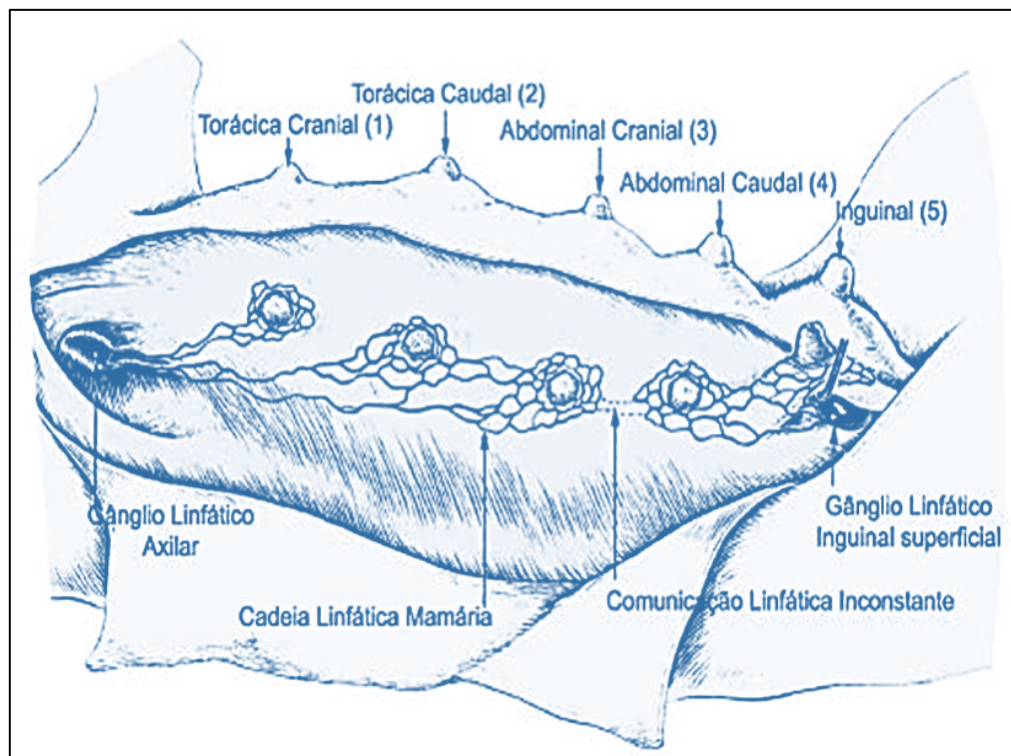


Figura 1. Representação do sistema linfático presente na cadeia mamária de cadelas. Pode-se observar que todas as mamas são interligadas ou se comunicam de alguma forma pelo sistema linfático. Fonte: Queiroga e Lopes, 2002.

Diferente das células epiteliais, as células mesenquimais se movem pela MEC. As células epiteliais são cuboides e dificilmente invadem a MEC, já as células mesenquimais são alongadas e possuem capacidade invasora (Figura 2) (HAY, 1995).

Durante a transição epitelial-mesenquimal, as células epiteliais passam a expressar genes específicos das células mesenquimais e perdem o fenótipo epitelial. As células epiteliais se tornam alongadas, com projeções citoplasmáticas (filopodia) e migram, assim como as células mesenquimais. A migração ocorre pelo aumento da produção de enzimas proteolíticas, que degradam componentes da

MEC, como colágeno (HAY, 1995).

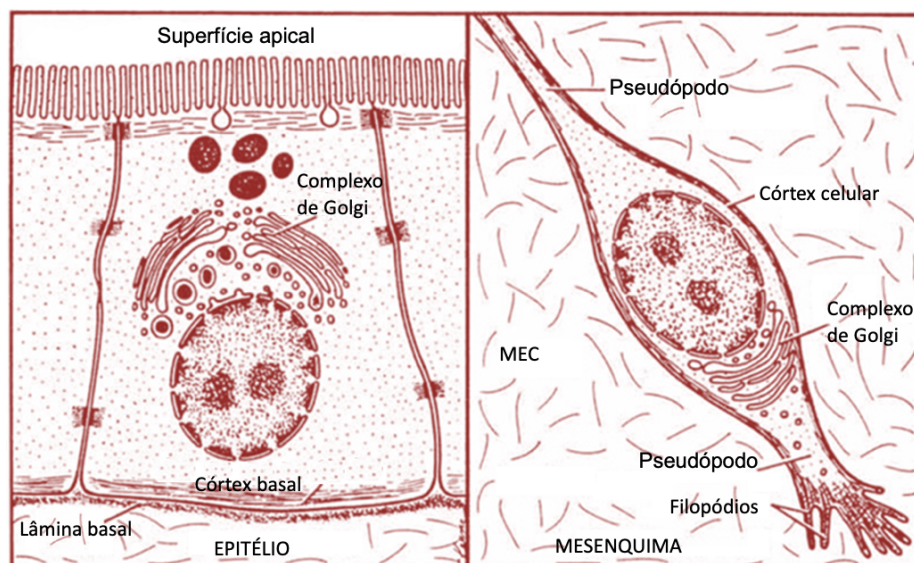


Figura 2. Diferenças fenotípicas das células epiteliais (esquerda) e mesenquimais (direita). As células epiteliais são dispostas lado a lado na lâmina basal, intimamente ligadas umas às outras. As células mesenquimais são livres, alongadas e apresentam pseudópodos. Fonte: HAY (1995).

A transição epitelial-mesenquimal pode ser ativada por vários oncogenes, por esse motivo, os tumores conseguem com facilidade participar desse processo. Dessa forma, as células epiteliais conseguem invadir a MEC e se tornam capazes de formar metástases em órgãos distantes, além de recidivas (HAY, 1995).

2.5 Estadiamento e fatores prognósticos

O estadiamento dos animais surgiu com a finalidade de auxiliar o profissional da saúde no tratamento do paciente oncológico, além de colaborar com a indicação de um prognóstico adequado. Foi proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e se baseia no sistema TNM, avaliando a extensão do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases distantes (M), como pode ser observado no Quadro 2 (OWEN, 1980).

Para o estadiamento, após a excisão cirúrgica do tumor, o mesmo deve ser enviado para o exame histopatológico para a correta identificação e classificação

da neoplasia. Nesta análise, será definido o grau de malignidade do tumor, seguindo os critérios de avaliação de malignidade como o tipo tumoral, pleomorfismo nuclear e celular, presença de áreas de necrose, invasão peritumoral e linfática e metástase em linfonodos regionais. O grau de malignidade pode ser dividido em I, II ou III (GOLDSCHIMIDT et al., 2011).

Além do grau de malignidade, outros fatores influenciam no prognóstico dos tumores. No caso dos tumores mamários, os aspectos mais importantes são idade da cadela, estágio e tamanho do tumor, ulceração do tecido tumoral, tipo histológico, comportamento clínico da neoplasia e se possui receptores de estrógeno (ALENZA et al., 1997). Caso o animal possua mais de um nódulo, cada um deve ser estadiado e ter seu prognóstico avaliado individualmente (SORENMO, 2003).

A avaliação do tamanho dos tumores (comprimento, largura e altura) é importante, uma vez que a classificação TNM os divide < 3 cm, entre 3 e 5 cm e > 5 cm. Os nódulos também podem ser classificados em não aderidos, aderidos em pele e aderidos em musculatura, o que é essencial para a decisão do tratamento mais adequado e para avaliação dos planos cirúrgicos. Os linfonodos regionais devem ser avaliados pela citologia aspirativa, e as metástases em órgãos distantes, por exame de imagem (radiografia e/ou ultrassonografia, principalmente os pulmões).

Com base nas avaliações do Quadro 2, é possível estadiar os tumores de mama em I, II, III, IV ou V, como representado no Quadro 3 (OWEN, 1980; SORENMO, 2003; SORENMO et al., 2011). Os animais com tumores considerados estágio IV têm uma sobrevida menor quando comparado aos outros estádios; e os tumores estágio V são considerados mais agressivos e com um prognóstico desfavorável (SORENMO, 2003). Contudo, apenas essa classificação não é suficiente para indicar o prognóstico da doença em cada indivíduo, uma vez que os tumores com mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes respostas à mesma terapia. Nem mesmo as características que são utilizadas para o estudo envolvendo a pesquisa de metástases classificam com precisão o comportamento clínico dos tumores e isso pode ocorrer em vista das diferenças biológicas dos tumores (VAN'T VEER et al., 2002; VIEIRA et al., 2008).

Quadro 2. Classificação baseada nos sinais clínicos encontrados no paciente, para determinação do estadiamento (TNM) de carcinomas mamários em cães (Adaptado de OWEN, 1980 e CASSALI et al., 2017).

TUMOR PRIMÁRIO (T)	LINFONODOS REGIONAIS (N)
T0: não é possível identificar o tumor primário	N0: sem metástase em linfonodo
T1*: tumores menores que 3 cm	N1**: linfonodo regional ipsilateral ao tumor
T2*: tumores entre 3 e 5 cm	N2**: linfonodos regionais bilaterais envolvidos
T3*: tumores maiores que 5 cm	METÁSTASE EM ÓRGÃO DISTANTES (M)
T4: carcinoma inflamatório de qualquer tipo	M0: sem metástase em órgãos distantes
	M1: presença de metástase em órgãos distantes, inclusive linfonodos distantes

* Tumores T1, T2 e/ou T3 também devem ter a sua mobilidade avaliada, podendo ser divididos em A (sem aderência), B (aderido à pele) e C (aderido em musculatura)

** Os linfonodos N1 e/ou N2 podem estar aderidos (A) ou não aderidos (B)

Quadro 3. Estádios das cadelas com tumores mamários.

	T	N	M
Estádio I	Qualquer T1 (< 3cm)	N0	M0
Estádio II	Qualquer T2 (3 - 5cm)	N0	M0
Estádio III	Qualquer T3 (> 5cm)	N0	M0
Estádio IV	Todos os T	N1	M0
Estádio V	Todos os T	Todos os N	M1

T: tamanho do tumor; N: acometimento dos linfonodos regionais; M: presença ou ausência de metástases distantes. Adaptado de OWEN, 1980 e CASSALI et al., 2017

A avaliação dos fatores prognósticos inclui a idade do paciente no momento do diagnóstico, o tamanho e o estadiamento do tumor, invasão linfática e vascular, graduação histológica e a expressão de receptores alpha de estrógeno (ER α), receptores de progesterona (PR), Ki-67, receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), citoqueratina basal 5/6 (CK 5/6) e fator de crescimento epidermal (EGFR) (NGUYEN et al., 2018). Além disso, a identificação desses fatores auxilia

na melhor escolha terapêutica para os pacientes, individualmente (ABADIE et al., 2018).

Os tumores luminais podem ser avaliados pela presença dos receptores hormonais (ER α e PR), Ki-67, CK5/6 e EGFR. O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, que pode ser dividido em dois subtipos, tumor luminal A, se a quantidade de Ki-67 estiver baixa e tumor luminal B, se a quantidade de Ki-67 estiver alta. O CK5/6 e EGFR ajudam na identificação de tumores tipo basal com comportamento agressivo (ABADIE et al., 2018).

É possível classificar os tumores mamários de cadelas pelos receptores que eles expressam e suas implicações prognósticas, podendo ser luminal A, luminal B, triplo negativo tipo basal, triplo negativo tipo não basal e HER2 superexpressos, como pode ser observado na Figura 3, assim como já é realizado em humanos. Os tumores triplo negativos não expressam os receptores ER α , PR e HER2, e podem ser divididos em tipo basal e tipo não basal. Os tumores tipo basal expressam EGFR e/ou CK 5/6 positivos e os tipo não basal, EGFR e/ou CK 5/6 negativos. (ABADIE et al., 2018). Os tumores triplo-negativos tipo basal são os que possuem o pior prognóstico para o paciente e não possuem uma terapia eficiente definida (NIELSEN et al., 2004; BLOWS et al., 2010; ABADIE, et al., 2018).

É importante estabelecer o prognóstico adequado individualmente, já que nem todos os pacientes se beneficiam do tratamento sistêmico adjuvante, além de sofrerem com os efeitos adversos dos fármacos utilizados. Um método preditivo tem a capacidade de selecionar os pacientes que tem benefícios com a terapia coadjuvante e diminuir a quantidade dos que se tratariam de forma desnecessária. Sugere-se que o prognóstico dos tumores de mama pode ser realizado pelo perfil de expressão gênica do tumor primário e os genes superexpressos podem se tornar possíveis alvos terapêuticos para novos fármacos (VAN'T VEER et al., 2002).

2.6 Tratamento

O tratamento de eleição é mais efetivo para a maioria das neoplasias mamárias é a mastectomia, que pode ser realizada de diferentes maneiras, como nodulectomia, mastectomia parcial ou mastectomia radical unilateral/bilateral. A

técnica cirúrgica escolhida depende de fatores como o tamanho do tumor, a localização, a condição clínica do animal no momento da intervenção e a ocorrência de metástases (CASSALI et al., 2017).

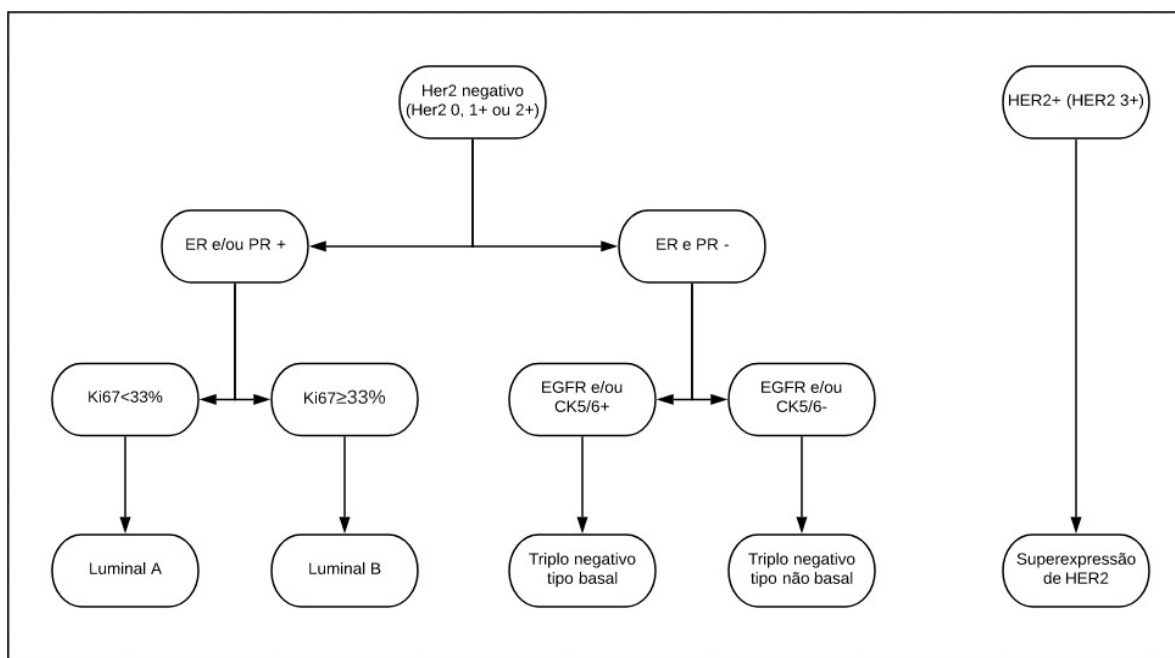


Figura 3. Diagrama dos tipos de classificação tumoral segundo a técnica de imunohistoquímica para os receptores ER, PR, HER2, EGFR, CK5/6, Ki-67, baseada na expressão positiva ou negativa dos mesmos. Fonte: (Adaptado de ABADIE et al., 2018).

A excisão cirúrgica do tumor permite sua avaliação histopatológica e pode ser a única terapia em casos de tumores benignos ou malignos sem metástases, pequenos, não invasivos e bem diferenciados, avaliados como estágio I, isso se as margens cirúrgicas estiverem livres. Em casos de carcinomas inflamatórios e metástases, a cirurgia é contraindicada (SLEECKX et al., 2011; CASSALI et al., 2017).

Alguns estudos demonstraram que a ovariectomia pode beneficiar animais com tumores hormônio-dependentes ER positivos e com altos níveis de estrogênio (KRISTIANSEN et al., 2016). Contudo, não é possível afirmar que a remoção precoce dos ovários previne o surgimento de tumores de mama ou é

efetiva, quando realizado junto à mastectomia como tratamento coadjuvante (DONNAY et al., 1995; FONSECA; DALECK, 2000; SLEECKX et al., 2011).

A quimioterapia deve ser utilizada como um tratamento coadjuvante à cirurgia para evitar recidivas locais, aparecimento de metástases e eliminar as células tumorais residuais após a remoção cirúrgica do tumor. Em animais com tumores avançados e metástases em linfonodos regionais e/ou distantes, é indicada quimioterapia como tratamento paliativo, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Também é indicada em casos de tumores indiferenciados, como adenocarcinomas de grau II e/ou III, carcinomas ou sarcomas indiferenciados e não é indicada em carcinomas inflamatórios (CIRILLO, 2008).

Os quimioterápicos atuam nas células com alto índice proliferativo, no caso os tumores, e em células normais que estão em constante replicação, como epitélio dos folículos pilosos, medula óssea e epitélio da mucosa gástrica. Por esse motivo, os efeitos adversos dos quimioterápicos são supressão da medula óssea, sinais gastrointestinais e alopecia (CIRILLO, 2008). A doxorrubicina associada com a ciclofosfamida, cisplatina, carboplatina, gencitabina e paclitaxel são os fármacos mais utilizados no tratamento de cadelas com neoplasias mamárias (DALECK; DE NARDI, 2016).

Tumores muito agressivos ou com pior prognóstico apresentam aumento da enzima COX-2 e, por esse motivo, a utilização de inibidores seletivos de COX-2 pode ser benéfica, concomitante aos outros tratamentos, para as neoplasias mamárias. Dentre os inibidores seletivos de COX-2, estão o piroxicam, firocoxibe, carprofeno e cetoprofeno (LAVALLE et al., 2009).

A hormonioterapia é pouco utilizada na medicina veterinária, mas é indicada para tumores com receptores de estrógeno e/ou progesterona em mulheres (CASSALI et al., 2017). A terapia endócrina com antagonistas hormonais, em tumores que possuem receptores, pode ajudar a evitar recidivas tumorais, associada com a mastectomia e a ovário-histectomia (FONSECA; DALECK, 2000; CASSALI et al., 2017).

A radioterapia pode ser uma alternativa adjuvante para o tratamento das neoplasias mamárias, principalmente nos casos em que os tumores não foram

completamente removidos, quando há metástases e em animais com carcinomas mamários (SORENMO, 2003; SLEECKX et al., 2011).

2.7 Cultivo celular

O estudo *in vitro* é importante para identificar e avaliar os mecanismos de ação dos fármacos, genes envolvidos na carcinogênese, como oncogenes e supressores tumorais, definir as vias de sinalização celulares e como elas contribuem para a patogênese tumoral (BROCK et al., 2018), além de testar a eficácia terapêutica de agentes antitumorais (GILLET; VARMA; GOTTESMAN, 2013). As células cultivadas *in vitro* são consideradas puras e facilmente propagáveis, podendo ser manipuladas geneticamente (VAN STAVEREN et al., 2009). O modelo pré-clínico de câncer em humanos é considerado essencial para a descoberta de novos fármacos e para o processo de desenvolvimento de drogas antitumorais (RUGGERI; CAMP; MIKNYOCZKI, 2014).

As vantagens dos estudos com células cultivadas *in vitro* são a utilização de mais de uma linhagem celular ou amostra de diferentes pacientes, aumentando o banco de dados, e a possibilidade de realizar os testes em várias repetições, seguindo os mesmos protocolos e em um mesmo estágio celular (mesmo número de passagens), tornando a validação dos resultados mais fidedigna (VAN STAVEREN et al., 2009; BROCK et al., 2018). Além disso, o cultivo celular, quando comparado a outros modelos experimentais, é realizado de forma relativamente rápida, com um custo razoável e em um ambiente controlado (BROCK et al., 2018).

As limitações da utilização desse método incluem a falta de interação das células com o microambiente tecidual e com a matriz extra-celular (MEC), que pode alterar a expressão gênica, contaminação com fibroblastos, contaminação com fungos ou bactérias, que alteram as propriedades do cultivo e instabilidade genômica devido ao alto número de passagens realizadas nas linhagens pré-estabelecidas (VAN STAVEREN et al., 2009; BROCK et al., 2018). Assim, os resultados provenientes do modelo *in vitro* podem ocorrer de forma diferente quando testados *in vivo* (BROCK et al., 2018). Mesmo com as limitações da técnica e os diferentes tipos de modelos experimentais, o cultivo celular de tumores é a técnica

mais utilizada para os estudos *in vitro* do câncer humano (VAN STAVEREN et al., 2009).

2.8 Oncogenes

A oncogênese é o processo de origem e desenvolvimento de uma neoplasia, a qual é mediada por oncogenes, que podem ser supressores ou promotores tumorais (CROCE, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011). É um processo complexo e são necessárias inúmeras etapas para uma célula normal se tornar uma célula cancerígena. Contudo, sabe-se que as alterações genéticas têm um papel crucial nessa transformação. Esses genes podem ser mutados por seis fatores que ocorrem na célula, como a capacidade de crescimento autossuficiente, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, apoptose, potencial de replicação ilimitado, angiogênese e capacidade de invasão tecidual e metástase (HUNTER, 1991; CANTLEY et al., 1991; HANAHAN; CROCE, 2008; WEINBERG, 2011).

Para a análise das alterações genéticas, alguns marcadores moleculares gênicos ou proteicos podem ser utilizados, os quais são úteis na detecção precoce do câncer, e auxiliam na avaliação da evolução dos tumores, localização de metástases e indicação do tratamento mais adequado. Exemplos desses marcadores tumorais é a super-expressão de *human epidermal growth factor receptor-type 2* (ERBB2 ou HER2), que são receptores do fator de crescimento epitelial associados à malignidade tumoral (SIDRANSKY, 2002).

A citoqueratina é um marcador de células epiteliais e quando encontrada no soro ou linfonodos, pode indicar a presença de células tumorais. Ademais, quando seu resultado é positivo nos linfonodos de pacientes com câncer, pode ser um indicativo de metástase, e é recomendado realizar terapias sistêmicas mais agressivas (SIDRANSKY, 2002). Outros importantes genes foram identificados, como TP53 (ligado à apoptose), CCND1 (regulador do ciclo celular), BRCA1 e BRCA2 (ligados à supressão tumoral). Para resultados mais sensíveis e específicos, é importante uma avaliação global da expressão gênica em tumores primários e suas metástases, a fim de realizar uma combinação de marcadores

(BERTUCCI et al., 2006).

2.9 Via *PI3K-AKT-mTOR*

A via *PI3K-AKT-mTOR* regula inúmeros processos celulares, incluindo apoptose, transcrição, metabolismo, angiogênese e progressão do ciclo celular. Ela está intimamente ligada à proliferação e longevidade das células. Alterações genéticas nessa via são frequentes em casos de câncer e sua inibição pode estar relacionada à prevenção e terapia de neoplasias (AVENDAÑO; MENÉNDEZ, 2008; GERSON et al., 2018).

O *mTOR* controla processos necessários para o crescimento e proliferação celular, incluindo biogênese de mRNA, síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, metabolismo de energia e autofagia. É um modulador importante do envelhecimento e de doenças relacionadas com idade avançada. Em indivíduos com câncer, a regulação da via do *mTOR* ocorre de maneira incorreta. O aumento da ativação do *mTOR* ocorre pelas mutações de ganho de função nos oncogenes (*PI3K*, *AKT*) e/ou pelas mutações de perda de função dos genes supressores tumorais (*PTEN*) (LI; KIM; BLENIS, 2014).

As mutações sofridas pelos oncogenes e/ou pelos genes supressores tumorais, geram um crescimento seletivo das células neoplásicas, quando comparada com as células normais (LI; KIM; BLENIS, 2014). Durante a carcinogênese humana, a proteína quinase B, conhecida como *AKT* está frequentemente alterada. Sua hiperativação está relacionada com a resistência celular a apoptose, além do aumento do crescimento, proliferação e metabolismo celular (HAY, 2005).

A atividade do *AKT* é regulada negativamente pelo gene supressor tumoral homólogo de fosfato e tensina (*PTEN*). A hiperativação do *AKT* ocorre por diferentes fatores, dentre estes, alguma mutação ou deleção do *PTEN*, muito frequente em neoplasias humanas. O *PTEN* também possui ação antagonista sobre a atividade da fosfoinositídeo 3-quinase (*PI3K*), que por sua vez regula negativamente a atividade do *AKT*, como observado na Figura 4 (HAY, 2005). Além disso, *mTOR* também pode regular a tradução de algumas proteínas (YU et al., 2001).

Um dos genes alvos do *mTOR* é a proteína de ligação *eLF-4E* (*4E-BP1*), que modula o efeito do complexo na tradução das proteínas. A *4E-BP1* se liga ao mRNA cap da proteína complexa de iniciação da tradução e, assim, inibe o início da tradução. Nos casos de neoplasia, esse alvo também está desregulado, permitindo assim que o *mTOR* promova maior tradução de proteínas (YU et al., 2001).

A inibição desse complexo é uma boa estratégia para a descoberta de novas terapias contra neoplasias, uma vez que inibiria a proliferação celular e induziria a apoptose. O ideal seria utilizar um inibidor da via *AKT-mTOR* junto com outro quimioterápico e/ou radiação, para diminuir os riscos de resistência tumoral (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004).

2.10 Rapamicina

Em 1975 um antibiótico produzido por um microorganismo foi descoberto no solo da Ilha de Páscoa (SEHGAL; BAKER; VÉZINA, 1975). Após a caracterização do microorganismo produtor, concluiu-se que era uma cepa de *Streptomyces hygroscopicus*. Em função do local de sua descoberta, o composto foi batizado de rapamicina (Rapa – Rapa Nui, o povo nativo da Ilha de Páscoa). Sua estrutura (C₅₁H₇₉N₀₁₃) foi descrita apenas em 1976 (SWINDELLS; WHITE; FINDLAY, 1978). A rapamicina é um metabólito antifúngico produzido pelo *Streptomyces hygroscopicus*, com ação imunossupressora e antiproliferativa em células de mamíferos (LI; KIM; BLENIS, 2014).

Martel, Klicius, Galet (1977) documentaram pela primeira vez a ação imunossupressora da rapamicina, inibindo o desenvolvimento de imunopatias em ratos Wister-Lewis. Outros estudos avaliaram a ação da rapamicina em diferentes tumores transplantados em ratos, demonstrando resultados promissores quanto a atuação em algumas linhagens celulares como melanoma, carcinoma de cólon, endimoblastoma e tumores mamários de ratos (Nacional Cancer Institute, Division of Cancer Treatment, 1981). A hipótese de que a rapamicina poderia ser utilizada para o tratamento de neoplasias foi reforçada em um estudo que demonstrou o efeito do fármaco inibindo o desenvolvimento de tumores transplantados em ratos imunossuprimidos, com resultados similares ao reportado

Nacional Cancer Institute. A partir daí, diversos estudos foram publicados demonstrando os efeitos anti-tumorais da rapamicina (ENG; SEHGAL; VÉZINA, 1984).

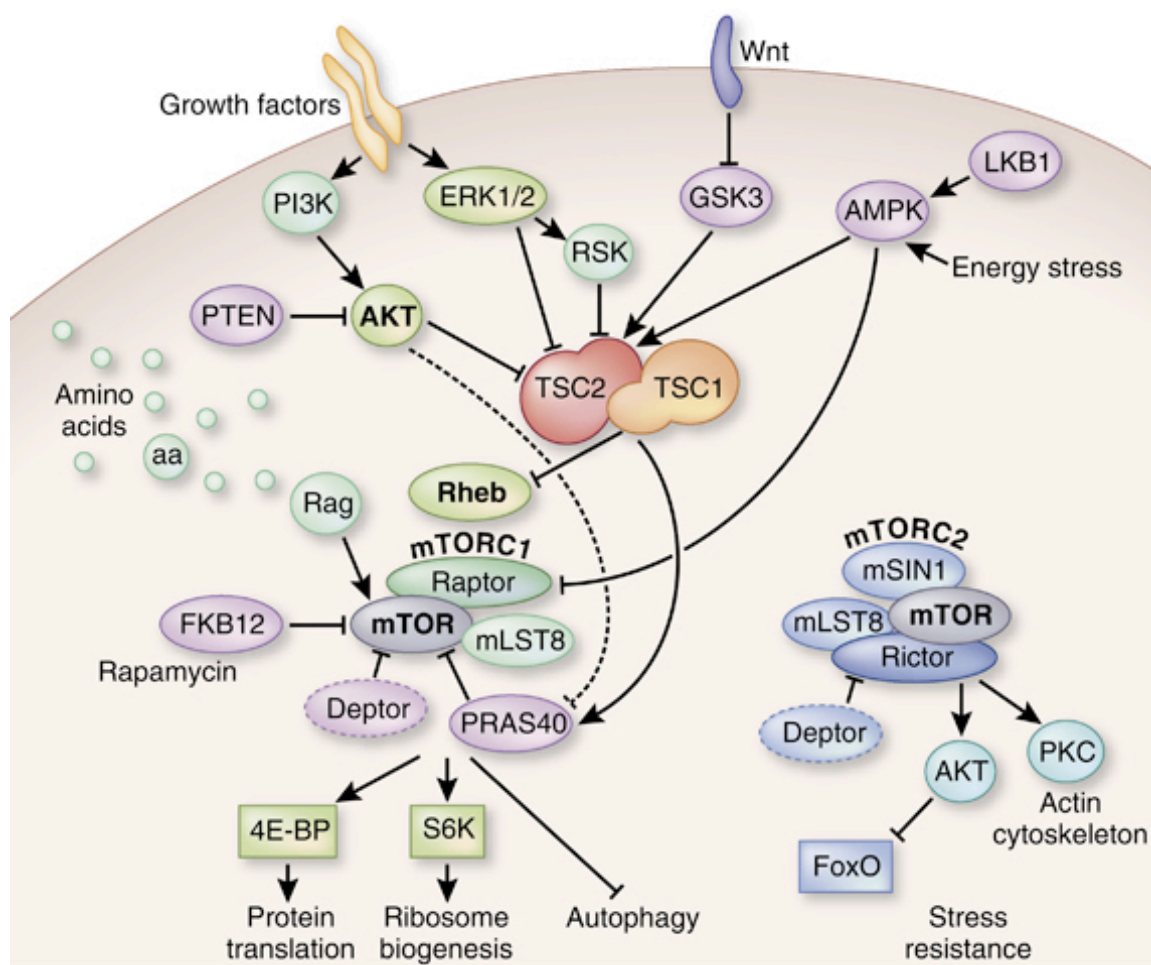


Figura 4. Ativação da via AKT-mTOR. A via AKT é modulada pelos genes *PTEN* e PI3K. Vários outros genes participam dessa via, que tem um papel importante na carcinogênese. Fonte: HUBER; WALZ; KUEHN, 2011.

Apenas após a descoberta do *mTOR*, que o mecanismo de ação da rapamicina compreendido. Antes disso sabia-se apenas que atuava diminuindo a proliferação celular bloqueando o ciclo celular no final da fase G1, porém não se conhecia o real alvo da rapamicina após a formação do complexo com a FK506 (SABERS et al., 1995). Este fármaco forma um complexo de ganho de função com

a proteína de ligação FK506 de 12 kDa (FKBP12), e este complexo se liga e age especificamente como inibidor do complexo *TOR* (*mTOR* ou *mTORC1*) dos mamíferos (LI; KIM; BLENIS, 2014).

O *mTOR* tem um importante papel na proliferação celular, tumorigênese e possivelmente sobrevivência celular e em células cultivadas *in vitro*, a inibição desse complexo pela rapamicina atenua a progressão do ciclo celular das neoplasias e pode até desencadear apoptose (HAY, 2005). A rapamicina atua na inibição do crescimento celular pelo bloqueio das proteínas TOR1 e TOR2, produzidas pelo complexo *mTOR*, que regulam a progressão do ciclo celular (YU et al., 2001; FOSTER; FOSCHI, 2009).

A rapamicina já foi testada em células cultivadas *in vitro* de diferentes órgãos, com sucesso na inibição da via *AKT-mTOR*, principalmente em células neurais e de neoplasias mamárias em humanos e ratos (NOH et al., 2004; PHUNG et al., 2007). Em cultivo celular de adenocarcinoma mamário humano, em uma concentração de 20nM a rapamicina foi capaz de diminuir a proliferação celular e teve este efeito potencializado quando associada com o resveratrol na dose de 100uM (ALAYEV et al., 2015). Na mesma dose a rapamicina também já se mostrou capaz de inibir o crescimento de células de carcinoma de pequenas células de pulmão (SEUFFERLEIN; ROZENGURT, 1996).

3. CONCLUSÃO

Apesar das similaridades entre as neoplasias humanas e caninas, as neoplasias em cães apresentam particularidades e necessitam de tratamento específico. A aplicação de protocolos de tratamento de humanos para animais é muitas vezes necessário, em vista da grande quantidade de estudos com humanos. Entretanto, estudos que possibilitem a compreensão tanto dos efeitos como das vias de ação dos fármacos que podem ser utilizados, são necessários para que o tratamento de pacientes oncológicos na medicina veterinária possa evoluir.

REFERÊNCIAS*

ABADIE, J.; NGUYEN, F.; LOUSSOUARN, D.; PEÑA, L.; GAMA, A.; RIEDER, N.; BELOUSOV, A.; BEMELMANS, I.; JAILLARDON, L.; IBISCH, C.; CAMPONE, M. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Research And Treatment*, v. 167, n. 2, p. 459-468, 2018.

ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters*, v. 15, n. 6, p. 8195-8205, 2018.

ALAYEV, A.; BERGER, S. M.; KRAMER, M. Y.; SCHWARTZ, N. S.; HOLZ, M. K. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells. *Journal Of Cellular Biochemistry*, v. 116, n. 3, p. 450-457, 2015.

ALENZA, M. D. P.; PENA, L.; NIETO, A. I.; CASTANO, M. Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, v. 33, n. 4, p. 581-585, 1997.

ALENZA, M. D. P.; TABANERA, E.; PEÑA, L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 219, n. 8, p. 1110-1114, 2001.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Drugs that inhibit signalling pathways for tumor cell growth and proliferation. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, p. 251-305, 2008.

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). *Ciência Rural*, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007.

BLOWS, F. M.; DRIVER, K. E.; SCHMIDT, M. K.; BROEKS, A.; VAN LEEUWEN, F. E.; WESSELING, J.; CHEANG, M. C.; GELMON, K.; NIELSEN, T. O.; BLOMQVIST, C.; HEIKKILÄ, P.; HEIKKUNEN, T.; NEVANLINNA, H.; AKSLEN, L. A.; BE'GIN, L. R.; FOULKES, W. D.; COUCH, F. J.; WANG, X.; CAFOUREK, V.; OLSON, J. E.; BAGLIETTO, L.; GILES, G. G.; SEVERI, G.; McLEAN, C. A.; SOUTHEY, M. C.; RAKHA, E.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; SHERMAN, M. E.; LISSOWSKA, J.; ANDERSON, W. F.; COX, A.; CROSS, S. S.; REED, M. W. R.; PROVENZANO, E.; DAWSON, S.; DUNNING, A. M.; HUMPHREYS, M.; EASTON, D. F.; GARCIA-CLOSAS, M.; CALDAS, C.; PHAROAH, P. D.; HUNTSMAN, D. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *Plos Medicine*, v. 7, n. 5, p. e1000279, 2010.

* Referências organizadas de acordo com ABNT (Associação Nacional de Normas Técnicas) – NBR 6023, Agosto /2002.

BONNETT, B. N.; EGENVALL, A.; OLSON, P.; HEDHAMMAR, A. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *The Veterinary Record*, v. 141, n. 2, p. 40-44, 1997.

BROCK, E. J.; JI, K.; SHAH, S.; MATTINGLY, R. R.; SLOANE, B. F. In vitro models for studying invasive transitions of ductal carcinoma in situ. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia*, p. 1-15, 2018.

BUTLER, M. Introduction: The use of animal cell culture. In: *Animal Cell Culture And Technology* (Ed). New York: Taylor & Francis p. 1-14, 2004.

CANTLEY, L. C.; AUGER, K. R.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANI, A.; KAPPELLER, R.; SOLTOFF, S. Oncogenes and signal transduction. *Cell*, v. 64, n. 2, p. 281-302, 1991.

CASSALI, G. D.; DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; LAVALLE, G. E.; DI SANTIS, G. W.; DE NARDI, A. B.; FERNANDES, C. G.; COGLIATI, B.; SOBRAL, R.; COSTA, F. V. A.; FERREIRA, E.; SALGADO, B. S.; CAMPOS, C. B.; D'ASSIS, M. J. M. H.; SILVA, L. P.; MACHADO, M. C. A.; FIRMO, B. F.; NUNES, F. C.; NAKAGAKI, K. Y. R. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 10, n. 3, p. 87-99, 2017.

CHILDRESS, M. O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 42, n. 1, p. 123-155, 2012.

CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. *Journal of Health Science Institute*. v. 26, n. 3, p. 325-327, 2008.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. *New England Journal Of Medicine*, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. *Oncologia em cães e gatos*. 2 ed. São Paulo: Roca, v. 1, p. 499-516, 2016.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v. 7, n. 2, 2002.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. N. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal Of Small Animal Practice*, v. 43, n.6, p. 240-246, 2002.

DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLHNAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues. *American Journal of Veterinary Research*, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.

ENG, C. P.; SEHGAL, S. N.; VÉZINA, Claude. Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors. *The Journal Of Antibiotics*, v. 37, n. 10, p. 1231-1237, 1984.

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

GERSON, S. L., CAIMI, P. F., WILLIAM, B. M., & CREGER, R. J. Pharmacology and molecular mechanisms of antineoplastic agents for hematologic malignancies. In: *Hematology*. Elsevier, 2018. p. 849-912.

GHONCHEH, M.; POURNAMDAR, Z.; SALEHINIYA, H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 17, n. S3, p. 43-6, 2016.

GILLET, J.; VARMA, S.; GOTTESMAN, M. M. The clinical relevance of cancer cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 105, n. 7, p. 452-458, 2013.

GIULIANO, A. E.; KIRGAN, D. M.; GUENTHER, J. M.; MORTON, D. L. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Annals of Surgery*, v. 220, n. 3, p. 391, 1994.

GOLDSCHMIDT, M.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GRÜNTZIG, K.; GRAF, R.; BOO, G.; GUSCETTI, F.; HÄSSIG, M.; AXHAUSEN, K. W.; POSPISCHIL, A. Swiss canine cancer registry 1955–2008: Occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex and neutering status on tumour development. *Journal Of Comparative Pathology*, v. 155, n. 2-3, p. 156-170, 2016.

HAMMOND, M. E. H.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D. C.; HAGERTY, K. L.; BADVE, S.; FITZGIBBONS, P. L.; FRANCIS, G.; GOLDSTEIN, N. S.; HAYES, M.; LESTER, S.; LOVE, R.; MANGU, P. B.; MCSHANE, L.; MILLER, K.; OSBORNE, C. K.; PAIK, S.; PERLMUTTER, J.; RHODES, A.; SASANO, H.; SCHWARTZ, J. N.; SWEEP, F. C. G.; TAUBE, S.; TORLAKOVIC, E. E.; VALENSTEIN, P.; VIALE, G.; VISSCHER, D.; WHEELER, T.; WILLIAMS, R. B.; WITTLIFF, J. L.; WOLFF, A. C.; HICKS, D. G. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of

estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 134, n. 7, p. 48-72, 2010.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995.

HAY, N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, v. 8, n. 3, p. 179-183, 2005.

HUBER, T. B.; WALZ, G. D.; KUEHN, E. W. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. *Kidney international*, v. 79, n. 5, p. 502-511, 2011.

HUGO, H.; ACKLAND, M. L.; BLICK, T.; LAWRENCE, M. G.; CLEMENTS, J. A.; WILLIAMS, E. D.; THOMPSON, E. W. Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal Of Cellular Physiology*, v. 213, n. 2, p. 374-383, 2007.

HUNTER, T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, v. 64, n. 2, p. 249-270, 1991.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; WEISE, C.; BONDZIO, A.; MULTHAUP, G.; EINSPIANIER, R.; GRUBER, A. D. Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer. *Journal Of Proteome Research*, v. 9, n. 12, p. 6380-6391, 2010.

KRISTIANSEN, V. M.; PEÑA, L.; DÍEZ CÓRDOVA, L.; ILLERA, J. C.; SKJERVE, E.; BREEN, A. M.; COFONE, M. A.; LANGELAND, M.; TEIGE, J.; GOLDSCHIMIDT, M.; SØRENMO, K. U. Effect of ovariohysterectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*, v. 30, n. 1, p. 230-241, 2016.

LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. F.; CASSALLI, G. D. COX-2 expression in canine mammary carcinomas correlation with angiogenesis and overall survival. *Veterinary Pathology Online*, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, 2009.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metabolism*, v. 19, n. 3, p. 373-379, 2014.

MACEWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 9, n. 2, p. 125-136, 1990.

MACEWEN, E. G.; PATNAIK, A. K.; HARVEY, H. J.; PANKO, W. B. Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer research*, v. 42, n. 6, p. 2255-2259, 1982.

MARTEL, R. R.; KLICIUS, J.; GALET, S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology*, v. 55, n. 1, p. 48-51, 1977.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. *Tumors In Domestic Animals*, p. 575-606, 2002.

NGUYEN, F.; PEÑA, L.; IBISCH, C.; LOUSSOUARN, D.; GAMA, A.; RIEDER, N.; BELOUSOV, A.; CAMPONE, M.; ABADIE, J. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Research And Treatment*, v. 167, n. 3, p. 635-648, 2018.

NIELSEN, T. O.; HSU, F. D.; JENSEN, K.; CHEANG, M.; KARACA, G.; HU, Z.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; LIVASY, C.; COWAN, D.; DRESSLER, L.; AKSLEN, L. A.; RAGAZ, J.; GOWN, A. M.; GILKS, C. B.; VAN DE RIJN, M.; PEROU, C. M. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 16, p. 5367-5374, 2004.

NOH, W. C.; MONDESIRE, W. H.; PENG, J.; JIAN, W.; ZHANG, H.; DONG, J.; MILLS, G. B.; HUNG, M.; MERIC-BERNSTAM, F. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 3, p. 1013-1023, 2004.

OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

OLIVEIRA, L. O. D.; OLIVEIRA, R. T. D.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. *Acta Scientiae Veterinariae*. Porto Alegre, RS, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004.

OWEN, L. N.; WORLD HEALTH ORGANIZATION. TNM classification of tumours in domestic animal, 1980.

PEÑA, L.; GAMA, A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ABADIE, J.; BENAZZI, C.; CASTAGNARO, M.; DÍEZ, L.; GÄRTNER, F.; HELLMÉN, E.; KIUPEL, M.; MILLÁN, Y.; MILLER, M. A.; NGUYEN, F.; POLI, A.; SARLI, G.; ZAPPULLI, V.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard

guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 1, p. 127-145, 2014.

PROSCHOWSKY, H. F.; RUGBJERG, H.; ERSBØLL, A. K. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE*, v. 58, n. 1-2, p. 63-74, 2003.

PHUNG, T. L.; EYIAH-MENSAH, G.; O'DONNELL, R. K.; BIENIEK, R.; SHECHTER, S.; WALSH, K.; KUPERWASSER, C.; BENJAMIN, L. E. Endothelial Akt signaling is rate-limiting for rapamycin inhibition of mouse mammary tumor progression. *Cancer Research*, v. 67, n. 11, p. 5070-5075, 2007.

QUEIROGA, F. L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PENA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology*, v. 94, n. 1-3, p. 181-187, 2005.

QUEIROGA, F. L.; RAPOSO, T.; CARVALHO, M. I.; PRADA, J.; PIRES, I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*, v. 25, n. 3, p. 455-465, 2011.

REIS, F. R.; BARREIRA, A. P. B.; CASTRO, V.; CASTRO, J. L. C.; SUZANO, S. M. C.; ROCHA, A. A. Índícios sobre a correlação entre diferentes métodos diagnósticos em casos de tumor de mama em cadelas. *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, v. 9, n. 9, p. 14-31, 2010.

RUGGERI, B. A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, Sa. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, v. 87, n. 1, p. 150-161, 2014.

RUTTEMAN, G. R.; MISDORP, W.; BLANKENSTEIN, M. A.; VAN DEN BROM, W. E. Oestrogen (ER) and progesterin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*, v. 58, n. 5, p. 594, 1988.

SABERS, C. J.; MARTIN, M. M.; BRUNN, G. J.; WILLIAMS, J. M.; DUMONT, F. J.; WIEDERRECHT, G.; ABRAHAM, R. T. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 2, p. 815-822, 1995.

SADLER, T. W. Da terceira à oitava semana – Período embrionário. *Langman. Embriologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ: G. Koogan, v. 13, p. 123-32, 2016.

SEHGAL, S. N.; BAKER, H.; VÉZINA, C. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic. *The Journal of antibiotics*, v. 28, n. 10, p. 727-732, 1975.

SEUFFERLEIN, T.; ROZENGURT, E. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Research*, v. 56, n. 17, p. 3895-3897, 1996.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 3, p. 210, 2002.

SIMEONOV, R.; STOIKOV, D. Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, v. 9, n. 3, p. 211-219, 2006.

SISSON, G. *Anatomia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 5, 1981.

SLEECKX, N.; DE ROOSTER, H.; VELDHUIS KROEZE, E. J. B.; VAN GINNEKEN, C.; VAN BRANTEGEM, L. Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 33, n. 3, p. 573-596, 2003.

SORENMO, K. U.; KRISTIANSEN, V. M.; COFONE, M. A.; SHOFR, F. S.; BREEN, A. M.; LANGELAND, M.; MONGIL, C. M.; GRONDHAL, A. M.; TEIGE, J.; GOLDSCHMIDT, M. H. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, n. 3, p. 162-172, 2009.

SORENMO, K. U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M. H. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K. U.; SHOFR, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 14, n. 3, p. 266-270, 2000.

SWINDELLS, D. C. N.; WHITE, P. S.; FINDLAY, J. A. The X-ray crystal structure of rapamycin, C₅₁H₇₉NO₁₃. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 56, n. 18, p. 2491-2492, 1978.

TRAPP, S. M.; IACUZIO, A. I.; JUNIOR, F. A. B.; KEMPER, B.; DA SILVA, L. C.; OKANO, W.; TANAKA, N. M.; GRECCO, F. C. A. R.; CUNHA-FILHO, L. F. C.; STERZA, F. D. A. M. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população hospitalar de cães e gatos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 47, n. 5, p. 395-402, 2010.

VAN STAVEREN, W. C. G.; SOLÍS, D. W.; HEBRANT, A.; DETOURS, V.; DUMONT, J. E.; MAENHAUT, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1795, n. 2, p. 92-103, 2009.

ZUCCARI, D. A. P. D. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, p. 38-41, 2001.

YU, K.; TORAL-BARZA, L.; DISCAFANI, C.; ZHANG, W. G.; SKOTNICKI, J.; FROST, P.; GIBBONS, J. J. mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v. 8, n. 3, p. 249-258, 2001.

HIPÓTESE

A rapamicina inibe o crescimento *in vitro* das células de carcinoma mamário primário e metastático de cadelas pela inibição da via *AKT*m-TOR.

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar o efeito antitumoral da rapamicina sobre as células de carcinoma mamário primário de cadelas e suas respectivas metástases cultivadas *in vitro*.

Específicos

- Avaliar os efeitos da rapamicina sobre a viabilidade das células de tumores de mama de cadelas, primários e suas metástases cultivadas *in vitro*.
- Avaliar o efeito da rapamicina na proliferação/migração celular.
- Avaliar expressão dos genes *AKT*, *PTEN* e *mTOR* antes e após o tratamento com rapamicina das células de tumores de mama de cadelas, primários e suas respectivas metástasesess cultivadas *in vitro*.
- Comparar o tumor primário e suas respectivas metástases em relação a expressão gênica

CAPÍTULO 2

ARTIGO I*
**Rapamycin anti-tumoral effect on primary and metastatic canine breast
tumor cells *in vitro***

P. F. Lainetti¹, A. F. Leis-Filho¹, P. E. Kobayashi², R. Laufer-Amorim², C. E.
Fonseca-Alves², F. F. Souza¹

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

²Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

³Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

Correspondence

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Bairro: Unesp Campus de Botucatu, CEP 18618-681, Botucatu, SP.

Email: fabiana.f.souza@unesp.br (FF Souza)

*Artigo redigido segundo as normas da Revista Semina: Ciências Agrárias, <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias>, ISSN 1679-0359, fator de impacto 0,349; ranqueada como B1 pelo QUALIS-CAPES de 2016.

Resumo

A rapamicina é um fármaco antifúngico com atividade antitumoral, que atua inibindo o complexo *mTOR*, já testada para o tratamento de neoplasias em diferentes órgãos, em humanos. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da rapamicina em células de cadelas de tumores mamários primários e suas respectivas metástases, cultivadas *in vitro*. Após a colheita dos tumores primários e suas metástases, as amostras foram classificadas por histopatologia como carcinoma sólido grau III e carcinoma adenoescamoso, como tumores triplo negativos não basal pela imunohistoquímica e tanto os tumores primários como suas metástases apresentaram expressão positiva para as proteínas *PTEN*, *AKT*, *mTOR* e *4EBP1* na imunofluorescência. Parte do tecido tumoral foi cultivado *in vitro* e as células foram avaliadas quanto a morfologia e fenótipo celular, expressão gênica (qPCR) e viabilidade celular (MTT). Os genes validados pela qPCR foram *AKT*, *mTOR* e *PTEN*, relacionados com a via *AKT-mTOR*. A expressão do gene *PTEN* estava diminuída e do *mTOR* aumentada nas células de tumores primários, quando comparadas as suas metástases. O tratamento com rapamicina e ensaio MTT foram realizados nas concentrações de 2, 5, 10 e 12 μM , por 24, 48 e 72 h. O ensaio de MTT mostrou que para uma diminuição de 50% da viabilidade celular, a concentração de rapamicina deve ser 2 μM para o carcinoma adenoescamoso e 10 μM para metástase. Para o carcinoma sólido grau III e sua respectiva metástase, a concentração utilizada foi de 12 μM . Pode-se concluir que a rapamicina pode ser utilizada para a inibição da proliferação celular dos dois tipos tumorais estudados e suas respectivas metástases.

Palavras-chave: via *AKT-mTOR*, câncer de mama, cultura celular, cadelas

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são alterações frequentes nas cadelas, assim como ocorre nas mulheres. As neoplasias mamárias compreendem cerca de 50% dos tumores diagnosticados em fêmeas caninas, e na maioria são malignas (SORENMO, 2003), sendo o carcinoma o tipo maligno mais comum (DOBSON et al., 2002). A formação de metástases em linfonodos e/ou órgãos distantes, como pulmão e ossos, também ocorre de forma usual, já que 30% das cadelas com tumores mamários malignos apresentam metástases (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

O cultivo celular *in vitro* de células neoplásicas tem sido usado como modelo experimental pré-clínico em testes com células de tumores em humanos, sendo considerado uma alternativa aos modelos *in vivo* (BUTLER, 2004). Neste modelo, é possível realizar testes de toxicidade celular farmacológica que auxiliam na descoberta de novas terapias e no estudo das vias em que atuam (BROCK et al., 2018; VAN STAVEREN et al., 2009). A rapamicina é um antifúngico, com efeitos imunossupressores e antiproliferativos, utilizado na quimioterapia de neoplasias em mulheres, já testado *in vitro* (NOH et al., 2004; FOSTER; TOSCHI, 2009) e em ratos *in vivo* (PUNG et al., 2007). Atua pela via *AKT-mTOR* em diferentes espécies (JACINTO et al., 2004), incluindo os cães (DELGADO; GÄRTNER; PEREIRA, 2015), modulando os genes TORC1 e TORC2 (LI; KIM; BLENIS, 2014).

A via *AKT-mTOR* está intimamente ligada à proliferação e crescimento celular, síntese de proteínas e apoptose. É um modulador importante do envelhecimento e das doenças relacionadas a esse fator. Na presença de neoplasias, essa via é regulada de maneira incorreta, pois há um aumento da ativação do complexo TOR (*mTOR*) por mutações de ganho de função nos oncogenes e de perda de função dos genes supressores tumorais (LI; KIM; BLENIS, 2014).

A rapamicina ainda não foi estudada para inibição do crescimento das células de tumores mamários de cadelas. Então, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos deste fármaco sobre a expressão gênica, viabilidade celular e proliferação/migração celular, de células de tumores mamários de cadelas,

primários e suas metástases, cultivadas *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados eram de alta pureza e adquiridos das empresas GE Healthcare (Uppsala, Suécia), Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil), Merck SA (São Paulo, Brasil), caso contrário, foram citados. Além disso, foi utilizado meio para cultivo celular *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (MEGM™, Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2 Comitê de Ética

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas e sob aprovação pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA), protocolo no. 0189/2018

2.3 Design Experimental

Amostras de tumor mamário primário e metastático foram colhidas de 2 cadelas, analisadas quanto a histopatologia, imunofluorescência e imunohistoquímica. Parte do tecido foi cultivado *in vitro*, analisado quanto á morfologia celular, fenótipo celular, expressão gênica (qPCR) e viabilidade celular (MTT) (Figura 1)

2.4 Aquisição das amostras de carcinoma mamário

As amostras iniciais foram colhidas das cadeias mamárias e seus respectivos sítios metastáticos de duas cadelas com tumores mamários espontâneos que realizaram a cirurgia de mastectomia.

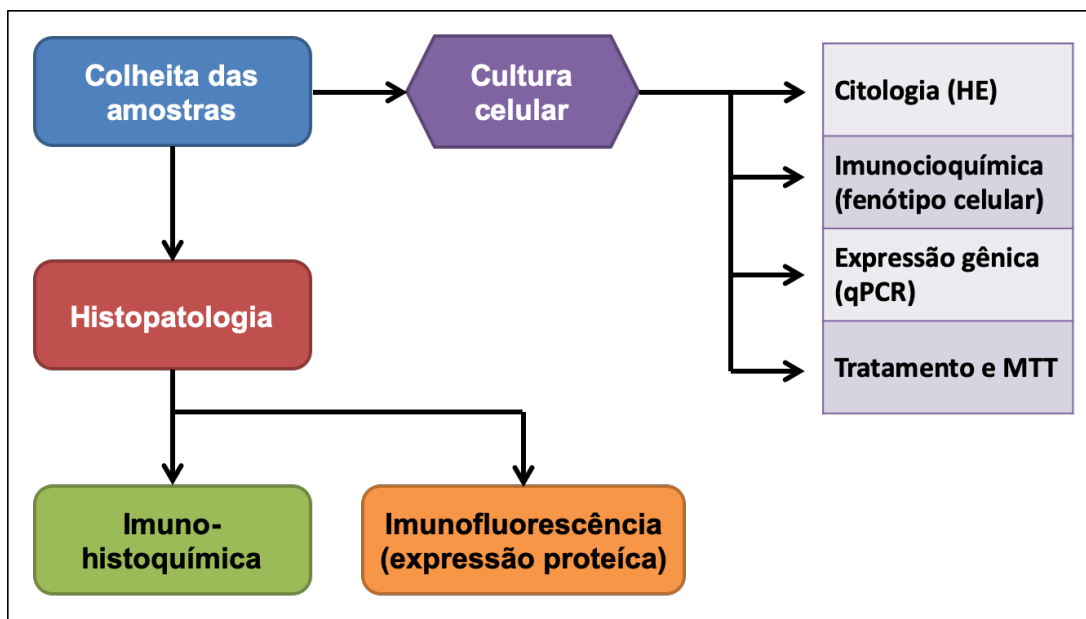


Figura 1. Design experimental.

Fragmentos de 1 cm² foram colhidos do tumor primário na cadeia mamária e também das metástases presentes em linfonodo esternal e úmero esquerdo. As amostras foram utilizadas para o cultivo celular, caracterização celular, classificação histológica, imuno-histoquímica (imunofenotipagem e imunofluorescência) e imunocitoquímica.

2.4.1 Análise histológica

A classificação histopatológica dos tumores foi de acordo com Goldschmidt et al. (2011), considerando-se o padrão de crescimento do tumor.

2.4.2 Análises Imuno-histoquímicas

As amostras de carcinoma mamário primário e metastático em parafina foram cortadas (3 µm), transferidas para lâminas com carga positiva e desparafinizadas (StarFrost, Braunschweig, Alemanha). Para os anticorpos HER2, ERα, PR, Ki-67, CK5/6 e EGFR, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão (Pascal, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 8% de peróxido de hidrogênio em metanol, durante 20 min e o bloqueio das ligações não

específicas foi realizado com 8% leite desnatado, durante 60 min, ambos em temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos e as amostras permaneceram incubadas de acordo com NGUYEN et al., (2018) (Tabela 1). A detecção dos anticorpos foi realizada utilizando-se com anticorpo secundário (EnVision™ Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O DAB (EnVision™ FLEX, High pH, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) foi utilizado como cromógeno e a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. Como controle negativo da reação, omitiu-se os anticorpos primários testados durante o procedimento, os quais foram substituídos por solução tampão TRIS.

Os ER α e PR, foram considerados positivos quando houve marcação $\geq 10\%$ dos núcleos, os receptores CK5/6 e EGFR, quando a marcação foi $\geq 10\%$ de citoplasma e o Ki-67 quando mais de 33,3% das células apresentaram o núcleo marcado, todos contados em um grupo de mais de 500 células (NGUYEN et al., 2018). A marcação de HER-2 foi classificada quanto à distribuição da marcação (0: sem marcação ou $<10\%$ de células tumorais marcadas; 1+: $>10\%$ das células tumorais marcadas, com marcação de membrana incompleta; 2+: marcação moderada a forte de $>10\%$ das células tumorais; 3+: marcação completa e forte da membrana de $>10\%$ das células tumorais). Nessa classificação, 0 e 1+ são consideradas marcações negativas e, 2+ e 3+, marcações positivas.

2.4.3 Imunofluorescência

As amostras de carcinoma mamário primário e metastático em parafina foram cortadas (3 μm), transferidas para lâminas com carga positiva e desparafinizadas (StarFrost, Braunschweig, Alemanha). Para os anticorpos *PTEN*, *4EBP1*, *AKT* e *mTOR*, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão (Pascal, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O bloqueio das peroxidase endógena foi realizado com 8% de peróxido de hidrogênio em metanol, durante 20 min e, posteriormente, o bloqueio das ligações não específicas foi realizado com 8% leite desnatado, durante 60 min, ambos em temperatura ambiente. Os anticorpos foram diluídos e as amostras permaneceram incubadas seguindo as orientações do fabricante, conforme as

informações na Tabela 2. A detecção dos anticorpos foi realizada utilizando anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A contra-coloração foi conduzida com DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Como controle negativo da reação, omitiu-se os anticorpos primários testados durante o procedimento, os quais foram substituídos por solução tampão TRIS.

Tabela 1 Anticorpos primários utilizados para o Imunofenótipo.

Antibody	Manufacture	Clone	Dilution	Immunolocalization
HER2	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suíça	4B5	1: 400	Membrane
ER α	Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA	C311	1: 50	Nuclei
PR	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Suíça	1E2	Prediluted	Nuclei
Ki-67	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	MIB1	1: 50	Nuclei
CK5/6	Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	D5/16B4	1: 10	Citoplasm
EGFR	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Corporation, Carlsbad, CA, USA	31G7	1: 20	Citoplasm

Tabela 2 Anticorpos primários utilizados na imunofluorescência.

Antibody	Manufacture	Especificity	Clone	Dilution	Secondary antibody
PTEN	ABGENT, San Diego, CA, USA	NA	Bs-0686R	1:500	Rabbit
p-AKT	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	Ser473	D9E	1:100	Rabbit
p-mTOR	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	Ser2448	49F9	1:100	Rabbit
p-4EBP1	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	Thr37/46	NA	1:100	Rabbit

*NA= não apresenta

As amostras teciduais foram avaliadas em microscópio confocal de varredura a laser (TCS SP 5, Leica, Wetzlar, Germany). As imagens foram digitalizadas e avaliadas por software específico (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, LAS AF, Wetzlar, Germany).

O controle positivo para *mTOR* foi próstata normal, para *4EBP1* foi tecido de

estômago normal, *PTEN* foi próstata normal e *AKT* foi cólon normal, seguindo as informações do *Protein Atlas* (www.proteinatlas.org).

As imagens foram digitalizadas (Leica Application Suite Advanced Fluorescence, LAS AF, Wetzlar, Germany) e avaliadas por software específico Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram representados pela média e erro padrão da porcentagem de expressão proteica.

2.5 Cultivo celular

2.5.1 Estabelecimento de cultivo celular

O cultivo celular foi realizado a partir dos fragmentos tumorais em meio *Mammary Epithelial Cell Growth Medium* (MEGM™) (Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), acrescido de 1% de solução antibiótica/antimicótica (TermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), mantidos em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37° C.

A expansão *in vitro* das células foi realizada após a dissociação dos fragmentos tumorais com enzima collagenase do tipo IV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37° C, durante 4 h. Após a dissociação, o conteúdo foi filtrado (Falcon cell strainers, 100 µm, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Para retirar o excesso de collagenase, as amostras foram centrifugadas (450 g, 5 min) e lavadas 3 vezes em meio *Dulbecco's modified eagle's medium* (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

A viabilidade das células foi determinada utilizando a coloração de azul de Tripan (Trypan blue solution, cód. T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em câmara de Neubauer (JAUREGUI et al., 1981).

Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em meio MEGM™, acrescido de 10% de SFB e o plaqueamento foi realizado em garrafas para cultivo com filtro de 25 mL de volume total (SPL Life Sciences, Daejeon, Coréia do Sul). As garrafas foram mantidas em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37° C, em uma concentração de 10⁴ células/mL.

Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi descartado e as

garrafas foram lavadas com DPBS estéril pH 7,2 para eliminar o SFB residual. Para o desprendimento das células da garrafa, foi adicionada tripsina (0,25%, GBICO ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37° C, seguido por um período de incubação de 5 min, em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37° C.

Após a expansão inicial das células (mínimo 72 h) parte das amostras foram criopreservadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Lonza Inc., Allendale, NJ, USA), acrescido de 11,8% DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 47% SFB. As amostras restantes foram expandidas e utilizadas para fenotipagem e morfologia celular, expressão gênica (qPCR) e avaliação da atividade metabólica celular (MTT) (MUNÓZ et al, 2016).

2.5.2 Fenótipo celular

Foi realizado cultivo das células em placa de 12 poços, com uma lamínula circular adicionada ao fundo, sem tratamento prévio, mantidas em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37° C. Após 72 h ou até as células atingirem no mínimo 50% de confluência sobre lamínula, o meio foi removido. Então, as células foram lavadas 3 vezes com DPBS.

Para a imunofluorescência e identificação do fenótipo celular, as células foram fixadas com metanol absoluto gelado (4° C) durante 30 min a 4° C. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com DPBS e permeabilizadas com 0,1% Triton-X diluído em tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS) durante 10 min em temperatura ambiente. A solução permeabilizante foi removida e as células lavadas 3 vezes com DPBS. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com o Protein Block (Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), durante 30 min em temperatura ambiente. Após sua remoção, as células foram novamente lavadas 3 vezes com DPBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para confirmar a origem epitelial das células *in vitro*, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-citoqueratina produzido em camundongo (clone AE1/AE3, Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1: 300 e o monoclonal anti-vimentina produzido em camundongo (clone V3, Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, USA), na diluição de 1: 300. As amostras foram incubadas por 24 h, a 4° C. Após esse

período, foi adicionado o anticorpo secundário (EnVision), e contra-corados com DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ambos seguindo as recomendações do fabricante. As lamínulas foram removidas da placa de cultivo, fixadas em lâmina com meio de montagem aquoso (Aquatex®, Merck, Darmstadt, Alemanha) com a face superior voltada para a face superior da lâmina. A leitura foi conduzida em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP 5 (Leica, Wetzlar, Germany), no aumento de 40X.

2.5.3 Morfologia celular

Os mesmos procedimentos realizados para a imunofluorescência e identificação do fenótipo celular foram conduzidos para avaliação da morfologia celular até a permeabilização. Posteriormente, a solução permeabilizante foi removida e as células lavadas 3 vezes com DPBS. Após a lavagem, as células foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), permanecendo na coloração de hematoxilina, durante 15 min e eosina 2 min.

As células também foram classificadas quanto ao tempo de duplicação celular. O meio das células foi descartado e as garrafas foram lavadas com DPBS estéril pH 7,2 para eliminar o SFB residual. Para o desprendimento das células da garrafa, foi adicionada tripsina (0,25%, GBICO ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37° C, seguido por um período de incubação de 5 min, em estufa úmida a 5% de CO₂ e 37° C. Após esse período, a tripsina foi inativada com meio de cultivo celular, suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica/antimicótica. As células foram centrifugadas (450 g, 5 min) e, após o descarte do sobrenadante, foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica/antimicótica. As células foram diluídas em azul de Tripán (Trypan blue solution, cód. T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na proporção de 1:1 e contadas em câmara de Neubauer. Após um período de 48 h, o mesmo procedimento foi realizado e as células foram contadas novamente.

Para o cálculo do *doubling time*, a concentração inicial e final foram utilizadas, juntamente com o período avaliado, na seguinte fórmula (ROTH, 2006):

$$Doubling\ Time = \frac{duration * \log(2) \log}{\log(FinalConcentration) - \log(InitialConcentration)}$$

2.5.4 qPCR

Para extração de RNAm as células criopreservadas foram descongeladas em banho úmido a 37° C, centrifugadas (450 g, 5 min) e ressuspensas em DMEM acrescido de 1% de solução antibiótica/antimicótica (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 10% de SFB. As células foram transferidas para placas de 6 poços e cultivadas até atingirem a confluência de 70%. Então, foram lavadas 3 vezes com DPBS em banho de gelo.

A extração do RNAm seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante (mini Kit RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany). A concentração e a pureza do RNAm foram avaliadas na A280 A260/A280 em espectrofotômetro (NanoDrop™, ND-8000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

O RNA total foi extraído e tratado para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, com 1 U de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Corporation, Carlsbad, CA, EUA) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25 mM de EDTA pH 8,0. A replicação do cDNA foi conduzida em termociclador (Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler, Applied Biosystems™, Life Technologies, Corporation, Carlsbad, CA, EUA). A transcrição reversa foi realizada de acordo com Rivera-Calderon et al. (2016).

As amplificações foram avaliadas em um termociclador automático (QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System, 4471087, Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) e processadas pelo sistema de detecção após um número variável de ciclos em fase exponencial. Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene de interesse e o gene de referência. Os genes endógenos de referência utilizados foram *RPS5*, *RPS19* e *HPRT* (selecionados em estudos prévios do grupo) e os três genes selecionados estão descritos na Tabela 3.

Os iniciadores para a amplificação dos genes de interesse foram desenhados utilizando o programa *Primer Express 2.0* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). Para amplificação foi empregado o kit *Power SYBR Green PCR Master MIX* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Os resultados da qPCR foram representados pelo QR.

2.5.5 Tratamento com rapamicina e avaliação da atividade metabólica celular

A atividade metabólica das células de tumor mamário primário e metastático cultivadas, tratadas ou não com rapamicina, foi determinada pela conversão do corante de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) de coloração amarela em formazana (coloração violeta), a qual indica o número de células viáveis. A tonalidade do violeta é diretamente proporcional à concentração das células viáveis na placa de cultivo.

As células tumorais foram transferidas para placas de 96 poços (10.000 células/poço) e após incubação de 24 h em meio de cultivo DMEM, a rapamicina (2 mg/mL em DMSO) foi adicionada em 4 concentrações (9, 10, 11 e 12 uM/poço). Após 24, 48 e 72 h foi adicionado o MTT (0,5 mg/mL em DPBS) e 4 h depois o DMSO. A análise dos resultados foi conduzida em 10 min após a adição do DMSO, em leitor de microplaca (Biochrom® Asys Expert Plus Microplate Reader, Biochrom Ltd, Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA), na absorvância de 550 nm. O teste foi realizado em seis repetições para cada concentração de rapamicina. Um controle com DMSO, na mesma concentração da maior dose da rapamicina, foi usado para garantir que não houve efeito do produto na proliferação celular.

Baseado nos resultados do teste, a concentração inibitória máxima (IC₅₀) da proliferação celular (NEGRI et al., 2009) foi determinada usando a fórmula: % atividade antioxidante = $100 - \frac{(\text{absorbância da amostra tratada} - \text{absorbância do blank})}{\text{absorbância das células controle}} \times 100$; considerando que o *blank* foi DPBS e as células do grupo controle não continham rapamicina.

2.6 Análise estatística

Os resultados das variáveis estudadas foram avaliados quanto a distribuição pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Os dados obtidos da qPCR foram analisados estatisticamente pelo teste t (*AKT*) ou Mann-Whitney (*PTEN* e *mTOR*).

Diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Os resultados do MTT foram analisados estatisticamente pelo teste Tukey.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos dos genes utilizados para a qPCR.

Access gene symbol*	Oligonucleotides sequence (5'>3')
<i>HPRT</i>	Forward primer (5'3') AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC
	Reverse primer (3'5') TTATAGTCAAGGGCATATCC
<i>RPS19</i>	Forward primer (5'3') CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG
	Reverse primer (3'5') GAACGAGGGATGCTACTCTTG
<i>RPS5</i>	Forward primer (5'3') TCACTGGTGAGAACCCCCT
	Reverse primer (3'5') TCACTGGTGAGAACCCCCT
<i>PTEN</i>	Forward primer (5'3') CGACGGGAAGACAAGTTCATG
	Reverse primer (3'5') TCACCGCACACAGGCAAT
<i>mTOR</i>	Forward primer (5'3') CTGGCCGGATGTAAACGAA
	Reverse primer (3'5') GCGTATCGATTCTCGCAATGA
<i>AKT</i>	Forward primer (5'3') TTCTACGGCGCCGAGATC
	Reverse primer (3'5') TTCTTGCAACCAGATGGCGCT

*GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)

3 RESULTADOS

3.1 Tecido de carcinoma mamário

As cadelas com carcinoma mamário, possuíam mais de 10 anos de idade, não eram castradas e apresentavam metástases. Uma das cadelas apresentava metástase óssea (úmero) e pulmonar, e a outra em linfonodo inguinal. Ambos os tumores foram classificados estágio V na classificação TNM.

Histologicamente, os tumores foram classificados como neoplasias epiteliais

malignas pouco diferenciadas, sendo um carcinoma sólido grau III e um carcinoma adenoescamoso. Como características histológicas continham poucos ou nenhum túbulo, pleomorfismo nuclear e diferentes colorações nucleares, 2 a 3 núcleos hipercromáticos ou presença de figuras de mitoses por campo observados microscopicamente (Figura 2).

Na imuno-histoquímica, as amostras de tumores primários e suas metástases foram classificadas como triplo negativas com imunofenótipo não basal (HER2-, ER-/PR- e EGFR-/CK-).

Os tumores primários e suas metástases, na imunofluorescência, apresentaram expressão positiva para os anticorpos *AKT*, *mTOR*, *PTEN* e *4EBP1*, como pode ser observado na Figura 3 e na Figura 4. Além disso, os tumores primários (n = 2) apresentaram média $\pm$ erro padrão da expressão para a proteína *PTEN* de $2,36 \pm 0,23\%$; *mTOR* $0,12 \pm 0,03\%$; *AKT* $2,32 \pm 0,73\%$; e *4EBP1* de $1,25 \pm 0,005\%$. Já as metástases (n = 2) apresentaram média $\pm$ erro padrão da expressão para o anticorpo *PTEN* de $24,67 \pm 4,38\%$; *mTOR* $4,05 \pm 1,67\%$; *AKT* $9,22 \pm 4,52\%$; e *4EBP1* de $17,55 \pm 2,31\%$.

3.2 Cultivo celular

Após a dissociação dos tumores, tanto primários, assim como suas metástases, as células foram mantidas em cultivo celular e expandidas.

Os tumores utilizados nesse estudo apresentaram expressão positiva para citoqueratina e vimentina, quando avaliados na imunofluorescência (Figura 5).

Na avaliação morfológica, as células do tumor primário e metastático do carcinoma adenoescamoso, apresentaram crescimento em monocamadas, em padrão fusiforme, núcleo basofílico e citoplasma eosinofílico, com presença de mitose. As células do carcinoma sólido grau III apresentaram células multinucleadas e formação de colônias (Figura 2).

3.2.1 qPCR

Os genes selecionados e validados pela qPCR foram *AKT*, *PTEN* e *mTOR* e os valores da qPCR foram representados pela quantificação relativa (QR).

Na avaliação pela qPCR, o gene *mTOR* apresentou maior expressão ($P < 0,0001$) nas células dos tumores primários quando comparadas as suas metástases. O *PTEN* ($P < 0,0001$) teve uma expressão maior nas células metastáticas quando comparado com as células primárias. O gene *AKT* apresentou expressão igual nos dois tipos tumorais.

A média e desvio padrão da QR para os genes no carcinoma sólido grau III primário foram *AKT* ($1,405 \pm 0,218$), *mTOR* ($1,336 \pm 0,218$) e o gene *PTEN* não teve expressão. Na metástase do carcinoma sólido grau III foram *AKT* ($0,822 \pm 0,021$), *mTOR* ($0,386 \pm 0,021$) e *PTEN* ($17.749,48 \pm 675,50$). Para o carcinoma adenoescamoso primário a média e desvio padrão foram *AKT* ($0,642 \pm 0,109$), *mTOR* ($0,763 \pm 0,109$) e *PTEN* ($1,00 \pm 0,086$). Para a sua metástase, *AKT* ($1,427 \pm 0,122$), *PTEN* ($23.352,77 \pm 3.050,14$) e *mTOR* ($0,623 \pm 0,122$).

3.2.2 Avaliação da atividade metabólica celular

O teste de MTT realizado nas células mamárias tumorais apresentaram diminuição da atividade metabólica celular em todas as concentrações e períodos de exposição ao fármaco testados, como pode ser observado nas figuras 7, 8 e 9 e 10. O carcinoma mamário adenoescamoso e sua metástase tiveram redução de 50% da viabilidade celular, ou seja, a IC_{50} , nas concentrações de $12 \mu M$, $5 \mu M$ e $10 \mu M$ nos períodos de 24, 48 e 72 h respectivamente. A IC_{50} do carcinoma mamário sólido grau III primário foi encontrado com $2 \mu M$, nos períodos de 24 e 72h e $10 \mu M$ em 48 h. Em contrapartida, sua metástase obteve o IC_{50} apenas em 24 h na concentração de $10 \mu M$, os demais períodos e doses diminuiram consideravelmente a viabilidade celular, correspondendo a mais de 70% de morte celular.

De modo geral, nas células de carcinoma adenoescamoso, primário e metastático, cultivadas *in vitro*, houve uma queda da viabilidade celular nas maiores concentrações de rapamicina às 24 h. Essa queda não foi tão acentuada às 48 e 72 h, exceto na concentração de $12 \mu M$. No caso do carcinoma sólido grau III e sua metástase, a viabilidade celular foi similar em todos os tratamentos. Foi observado em geral uma menor viabilidade às 48 e 72 h, principalmente nos tratamentos de 10 e $12 \mu M$.

O comportamento celular ao passar do tempo em todos os tratamentos, tanto nos tumores primários como em suas metástases, foram diferentes. De forma geral, a maioria da viabilidade celular foi reduzida de acordo com o tempo, tanto nos grupos tratados como no controle.

4 DISCUSSÃO

Foram usados dois tumores mamários com subtipos histológicos agressivos (carcinoma sólido grau III e carcinoma adenoescamoso), com maiores chances de desenvolver metástases, segundo a classificação de Goldschmidt et al. (2011). Em ambos animais, os tumores de mama haviam desenvolvido metástases, o carcinoma sólido grau III em osso e o carcinoma adenoescamoso em linfonodo. Os tumores mamários de cadelas, primários e suas metástases, foram classificados pela imuno-histoquímica como triplo negativos não basal. Esse subtipo histológico tem o comportamento mais agressivo e com prognóstico desfavorável, pois não expressam os receptores para HER2, estrogênio (ER α) e progesterona (PR), além se não expressarem citoqueratina (CK5/6) e/ou fator de crescimento epidermal (EGFR). O fato de não expressarem os receptores hormonais dificulta a associação da terapia alvo (FOULKES et al., 2010).

Infelizmente, o uso de painéis de imuno-histoquímica e o tratamento personalizado dos pacientes com foco na terapia alvo ainda não é uma realidade no tratamento das neoplasias dos animais como é na medicina humana. A terapia alvo atua diretamente em receptores que as células tumorais expressam. No caso dos tumores de mama, muitos expressam ER, PR e HER2, bloqueando estes receptores pode-se diminuir a proliferação celular, proporcionando uma maior chance de sucesso no protocolo terapêutico (SAWYERS, 2004; FOULKES et al., 2010).

A imunofluorescência do tecido histológico mamário foi utilizada para comprovar a expressão dos anticorpos dos genes selecionados *AKT*, *mTOR*, *PTEN* e *4EBP1*. Além disso, esse resultado valida a qPCR realizada nas células cultivadas *in vitro*, comprovando que os resultados obtidos do cultivo celular são confiáveis e podem ser usados como um modelo experimental *in vitro*, nesta espécie. Tais

observações já foram mencionadas em humanos (BROCK et al., 2018; VAN STAVEREN et al., 2009). O modelo proposto neste artigo também poderia ser usado como modelo experimental também para humanos, já que as características tumorais como a classificação, idade que os tumores se desenvolvem, influência hormonal, genes expressos na oncogênese e as proteínas produzidas são semelhantes nas espécies (ABDELMEGEED; MOHAMMED, 2018; KLOPFLEISCH et al., 2010).

As células foram utilizadas a partir da passagem 10 (P10), após a expansão, já que a partir da passagem 5 (P5) tendem a apresentar morfologia epitelial, capacidade de formar aglomerações e multiplicam-se com facilidade, com um mesmo padrão de fenótipo celular (TURIN et al., 2014; MUÑOZ et al., 2016). Ademais, a partir de várias passagens, elimina-se a contaminação com fibroblastos que crescem concomitante às células tumorais. Já foi estudado, que as células mantêm sua morfologia e fenótipo, quando comparadas as passagens 4 e 20 (TURIN et al., 2014). Contudo, as células podem sofrer alterações genéticas durante o crescimento *in vitro* (MUÑOZ et al., 2016), o que pode interferir nas avaliações realizadas. A expressão proteica de *mTOR*, *AKT* e *PTEN* nas amostras de tecido nos tumores primários e suas respectivas metástases demonstra que essas alterações não foram adquirida durante o processo de expansão celular.

O resultado do ensaio de MTT mostrou que as células dos tumores mamários responderam ao tratamento com rapamicina, identificando a IC_{50} nas concentrações de 2, 10 e 12 μM , nas 24 horas, nas células de carcinoma adenoescamoso primário, sua metástase e a mesma concentração para carcinoma sólido grau III primário e metastático, respectivamente. A exposição ao fármaco por mais de 24 horas prejudicou atividade metabólica celular, da mesma forma que inibiu o crescimento das células de tumores mamários em mulheres e ratas (NOH et al., 2004; PUNG et al., 2007).

As concentrações da rapamicina variaram nos diferentes tipos tumorais estudados. Aparentemente, cada tipo celular possui uma IC_{50} e tempo particular para a resposta à rapamicina. Esses mesmos resultados foram encontrados em linhagens de células de tumores mamários de mulheres. Segundo Noh et al. (2004),

as concentrações de rapamicina para inibir o crescimento celular *in vitro* em 7 linhagens de tumores mamários de mulheres ficaram entre 1 e 100 nM, durante um período de até 96 h. Em outro estudo, duas linhagens tiveram sua IC₅₀ com doses de 20 nM e 10 µM (FOSTER; TOSCHI, 2009).

As diferentes concentrações da rapamicina nos cultivos celulares de tumores de mama em cadelas mostram que alguns tipos celulares possuem uma sensibilidade maior à ação da rapamicina. Assim como em ratos, em que foi demonstrado que a atividade da rapamicina é dose-dependente, tanto *in vivo* como *in vitro* (PHUNG et al., 2007; GUBA et al., 2012). As concentrações de rapamicina utilizadas para obtenção da IC₅₀ foram similares nas células do tumor primário e metastático do carcinoma sólido grau III. Já no carcinoma adenoescamoso, as concentrações utilizadas foram diferentes. A metástase é mais resistente a rapamicina em 24 h e precisou de uma concentração maior do fármaco para que ocorresse a inibição celular. Baseado nos resultados do MTT e da IC₅₀, pode-se pressupor que as metástases necessitam de uma concentração maior de rapamicina, o que também pode indicar que o tratamento de animais com metástases pode exigir doses maiores.

Os resultados da qPCR mostram que o *mTOR* estava diminuído nas células tumorais metastáticas e o *PTEN* aumentado, quando comparado à expressão nas células tumorais primárias. Esses resultados são compatíveis com a diferença da resposta à rapamicina, que pode estar relacionada ao fato de que cada linhagem/tipo celular pode ter uma expressão diferente dos genes da via *AKT-mTOR*. Muitos tumores apresentam a perda do *PTEN* e com isso há uma ativação da via *AKT-mTOR* e nos casos de menor expressão do *PTEN*, os tumores aparentam ser mais sensíveis à rapamicina. Por isso, o *PTEN* pode ser um dos reguladores da ação da rapamicina, assim como o aumento da expressão de *mTOR* (GUERTIN; SABATINI., 2005; SASRBASSOV et al., 2006).

Nas células tumorais, a concentração da rapamicina para encontrar a IC₅₀ foi maior nas metástases, que pode ser explicado pelo fato dessas células terem apresentado menor expressão de *mTOR* na qPCR. A avaliação da expressão do *mTOR* de uma forma quantitativa pode ser um fator preditivo para a eficácia da

terapia com rapamicina, uma vez que quem apresenta uma maior expressão de *mTOR* aparentemente é mais sensível ao fármaco.

A expressão gênica do *PTEN* estava diminuída e de *mTOR* aumentada nas células tumorais primárias, o que pode ser relevante na ocorrência de metástases, uma vez que, nestes casos as células tumorais, além de terem o *mTOR upregulated*, que é responsável pelo aumento da proliferação e migração celular, têm também o *PTEN downregulated*, responsável por realizar um *feedback* negativo na via *AKT-mTOR* (SAAL, et al., 2005). O aumento da ativação do complexo TOR, em indivíduos com neoplasias, ocorre por mutações de ganho de função nos oncogenes (*AKT*) e/ou pela perda de função dos genes supressores tumorais (*PTEN*). Uma justificativa para isto é de que durante o processo de formação de metástases e progressão tumoral, as neoplasias primárias tendem a expressar mais fatores que aumentem a proliferação celular, já que para se tornarem metástases, as mesmas tiveram que se multiplicar no tumor primário e invadir e atingir o sistema linfático ou a via hematogêna (SAAL et al., 2005). Dessa forma, faz sentido que o complexo TOR esteja mais expresso nesse tipo de tumor, para que haja uma maior proliferação e aumento do metabolismo dessas células e o desenvolvimento de resistência a apoptose (KLOPFLEISCH et al. 2010; LI; KIM; BLENIS; 2014).

A expressão gênica do *AKT* foi similar nos dois tipos celulares de tumores de mama estudados e pode estar relacionada com o aumento do gene *mTOR*. O gene *AKT* é um regulador positivo do complexo TOR e sua *upregulation* está ligada com a resistência celular a apoptose e com o aumento da proliferação e metabolismo celular, além de estimular o crescimento das células neoplásicas (LI, KIM, BLENIS, 2014). Por sua vez, o *AKT* é regulado pelo gene de supressão tumoral homólogo *PTEN*, ou seja, quando o *PTEN* sofre uma perda de função por mutação ou deleção, ele não atua controlando a expressão do *AKT*, que fica superativado e assim, o complexo TOR também é estimulado (HAY, 2005).

5 CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, concluímos que a rapamicina foi capaz de reduzir a viabilidade das células cultivadas do carcinoma sólido grau III e

adenoscamoso e suas respectivas metástases cultivadas *in vitro*. Além disso, as células do tumor primário do carcinoma sólido grau III e sua metástase apresentaram um comportamento similar quando tratadas com rapamicina, mesmo apresentando uma expressão gênica diferenciada.

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

1. Abreu KC, Junior LASV. Microarrays no carcinoma mamário: aspectos genéticos. *Revista de Medicina* 2010;89(2):101-105.
2. Baker SS, Cardullo RA, Thaler CD. Sonication of mouse sperm membranes reveals distinct protein domains. *Biology of Reproduction* 2002;66(1):57-64.
3. Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer principles and potential clinical applications. *Molecular & Cellular Proteomics* 2006;5(10): 1772-1786.
4. Bonnett BN, Egenvall A, Olson P, Hedhammar A. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *The Veterinary Record* 1997;141(2):40-44.
5. Cordeiro YG, Xavier, PLP, Rochetti AL, et al. Transcriptomic profile reveals molecular events associated to focal adhesion and invasion in canine mammary gland tumour cell lines. *Veterinary and Comparative Oncology* 2018;16(1):E89-E98.
6. Daleck CR, Franceschini PH, Alessi AC, Santana ÁE, Martins MIM. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino: clinical and surgical evolution. *Ciência Rural* 1998;28(1):95-100.
7. Fonseca CS, Daleck CR. Canine mammary tumors: hormonal influence and effects of ovarihiysterectomy as an adjuvant therapy. *Ciência Rural* 2000;30(4):731-735.
8. De Nardi AB, Rodaski S, Sousa RS, et al. Prevalência de neoplasias e

modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science* 2002;7(2):15-26.

9. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JLN. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice* 2002;43(6):240-246.

10. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992;20(6):479-489.

11. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403-410.

12. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology* 2011;48(1):117-131.

13. Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willett W. Breast cancer. *New England Journal of Medicine* 1992;327(6):390-398.

15. Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galletti PM. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes—freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 1981;17(12):1100-1110.

16. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 2009;59(1):31-44.

17. Klopffleisch R, Klose P, Weise C, et al. Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: similarities to and differences from human breast cancer. *Journal of proteome research* 2010A;9(12):6380-6391.

18. Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD. Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC cancer* 2010B;10(1):618.

19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25(4):402-408.

10. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas PD.

PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic acids research* 2016;45(D1):D183-D189.

21. Muñoz JJ, Drigo SA, Kuasne H, et al. A comprehensive characterization of cell cultures and xenografts derived from a human verrucous penile carcinoma. *Tumor Biology* 2016;37(8):11375-11384.

22. Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2010;30(2):177-185.

23. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Prognostic variables in node-negative and node-positive breast cancer* Springer, Boston, MA, 1998:3-16.

24. Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidoy E, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: A lymphographic study. *Anatomia, histologia, embriologia* 2006;35(4):228-234.

25. Perou CM, Jeffrey SS, Van De Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96(16):9212-9217.

26. Pucci-Minafra I, Di Cara G, Musso R, et al. Retrospective Proteomic Screening of 100 Breast Cancer Tissues. *Proteomes* 2017;5(3):15.

27. Raposo TMM. *Valor prognóstico da expressão gênica e proteica do ATM, p53 e VEGF em cadelas com neoplasias mamárias* 2015.

28. Sahabi K, Selvarajah GT, Abdullah R, Kqueen CY, Chin TG. Comparative aspects of MicroRNA Expression in Canine and Human Cancer. *Journal of Veterinary Science* 2018;19(2):162-171.

29. Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. emPAI Calc—for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* 2009;26(4):576-577.

30. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002;2(3):210-219.

31. Sleenckx N, De Rooster H, Veldhuis Kroeze EJB, Van Ginneken C, Van Brantegem L. Canine mammary tumors, an overview. *Reproduction in Domestic*

Animals 2011;46(6):1112-1131.

32. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33(3):73-596.

33. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100(14):8418-8423.

34. Strandberg JD, Goodman DG. Animal model of human disease: canine mammary neoplasia. *The American journal of pathology* 1974;75(1):225.

35. Souza FF, Chirinéa VH, Martins MIM, Lopes MD. Identificação da osteopontina no plasma seminal e na membrana espermática de cães. In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), Costa do Sauípe - BA. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007;35(1):1305.

36. Van't Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415(6871):530-536.

37. Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL, Zeferino LC. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2008:42-47

38. Villén J, Gygi SP. The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature protocols* 2008;3(10):1630.

39. World Health Organization (WHO) 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Accessed November 29, 2017

40. Yu RMC, Cheah YK. The roles of miRNAs in human breast cancer and canine mammary tumor. *Applied Cancer Research* 2017;37(1):37.

41. Nguyen F, Peña L, Ibisch C, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. *Breast cancer research and treatment* 2018;167(3):635-648.

42. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS medicine* 2010;7(5):e1000279.

43. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical

characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research* 2004;10(16):5367-5374.

44. Abadie J, Nguyen F, Loussouarn D, et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and et al. prognostic significance. *Breast cancer research and treatment* 2018;167(2):459-468.

45. Rivera-Calderón LG, Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, et al. Alterations in *PTEN*, *MDM2*, *TP53* and *AR* protein and gene expression are associated with canine prostate carcinogenesis. *Research in veterinary Science* 2016;106:56-61.

46. Aragao AZ, Belloni M, Simabuco FM, et al. Novel processed form of syndecan-1 shed from SCC-9 cells plays a role in cell migration. *PLoS One* 2012;7(8):e43521.

47. Mi H, Poudel S, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic acids research* 2015;44(D1):D336-D342.

48. Negri MLS, Possamai JC, Nakashima T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa-Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Rev. bras. Farmacogn* 2009;19(2b):553-556.

49. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell* 2005;8(3):179-183.

50. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism* 2014;19(3):373-379.

51. Abdelmegeed SM, Mohammed S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology letters* 2018;15(6):8195-8205.

52. Brock EJ, Ji K, Shah S, Mattingly RR, Sloane BF. In vitro models for studying invasive transitions of ductal carcinoma in situ. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2018:1-15.

53. Butler M. Introduction: The use of animal cell culture. In: *Animal cell culture and technology* (Ed). New York: Taylor & Francis 2004:1-14.

54. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JLN. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice* 2002;43(6):240-246.

55. Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, et al. mTOR, a novel target in breast cancer:

the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2001;8(3):249-258.

56. Noh, WC, Mondesire WH, Peng J, et al. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 2004;10(3):1013-1023.

57. Phung, TL, Eyiah-Mensah, G, O'donnell, RK, Bieniek, R, Shechter, S, Walsh, K, Kuperwasser, C, Benjamin, LE. Endothelial Akt signaling is rate-limiting for rapamycin inhibition of mouse mammary tumor progression. *Cancer research* 2007;67(11):5070-5075.

58. Jacinto, E, Loewith, R, Schmidt, A, Lin, S, Rüegg, MA, Hall, A, Hall, MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology*, v. 6, n. 11, p. 1122, 2004.

59. Delgado, L, Gärtner, F, Pereira, PD Activation of Mammalian target of rapamycin in canine mammary carcinomas: an immunohistochemical study. *Journal of comparative pathology*, v. 152, n. 2-3, p. 138-144, 2015.

60. Roth V. 2006 Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>

61. Turin, I., Schiavo, R., Maestri, M., Luinetti, O., Bello, B., Paulli, M. & Tanzi, M. (2014). In vitro efficient expansion of tumor cells deriving from different types of human tumor samples. *Medical Sciences*, 2(2), 70-81.

62. Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 294, 2004.

63. Foulkes, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. *New England journal of medicine*, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.

64. Guba, M., von Breitenbuch, P., Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M. & Jauch, K. W. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine*, 8(2), 128.

65. Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* 11, 353–361.

66. Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., ... & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*, 22(2), 159-168.

67. SAAL, Lao H. et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research*, v. 65, n. 7, p. 2554-2559, 2005.

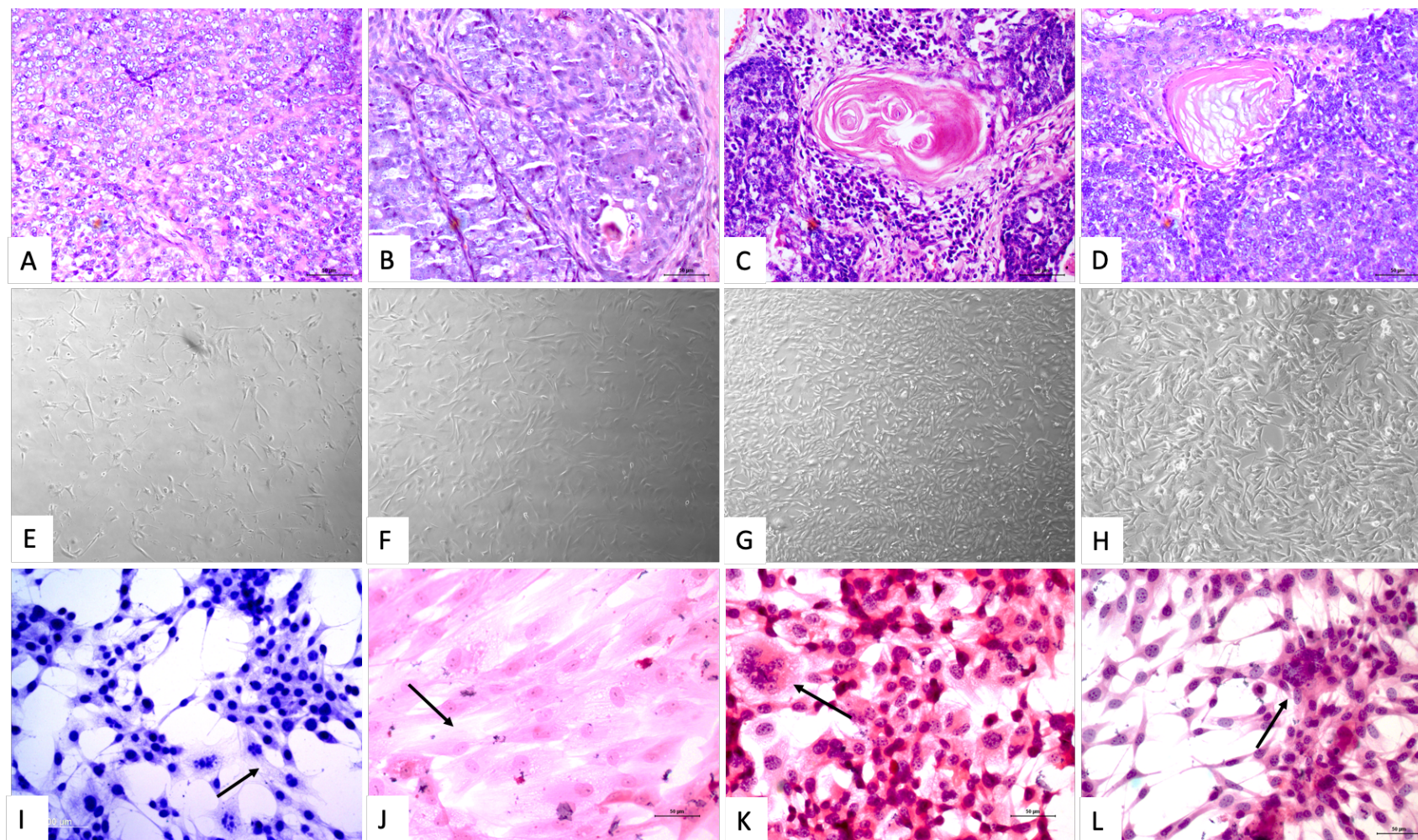


Figura 2. Avaliação histopatológica (A, B e C) das amostras dos tecidos dos tumores mamários primários e suas metástases, no aumento de 40x. Carcinoma sólido grau III (A) e sua respectiva metástase (B), e carcinoma adenoescamoso (C) e sua metástase (D). Cultivo celular *in vitro* (E, F, G e H) das células dos tumores mamários primários (E e F) e suas metástases (G e H), no aumento de 50x. Coloração de H&E (I, J, K e L) das células cultivadas *in vitro*, no aumento de 200x. Na figura as setas indicam células multinucleadas (K), células alongadas e com amplo citoplasma (I e J) e formação de colônia (L).

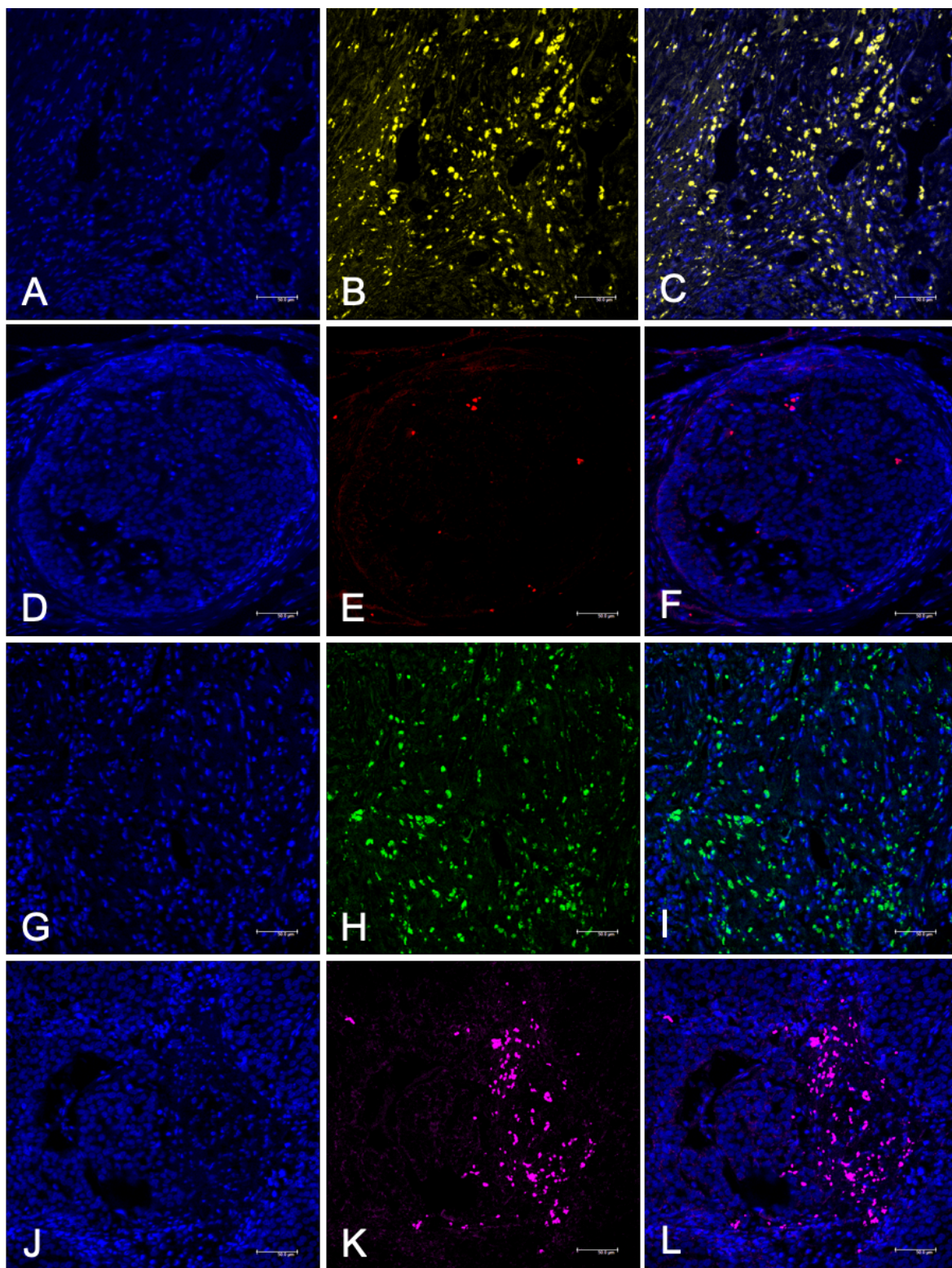


Figura 3. Imunofluorescência do tumor de mama primário de cadela. Coloração com DAP-I (A, D, G e J) coloração com FITC (B, E, H e K) e Merge (C, F, I e L). Expressão positiva para as proteínas *PTEN* (C), *mTOR* (F), *AKT* (I) e *4EBP1* (L).

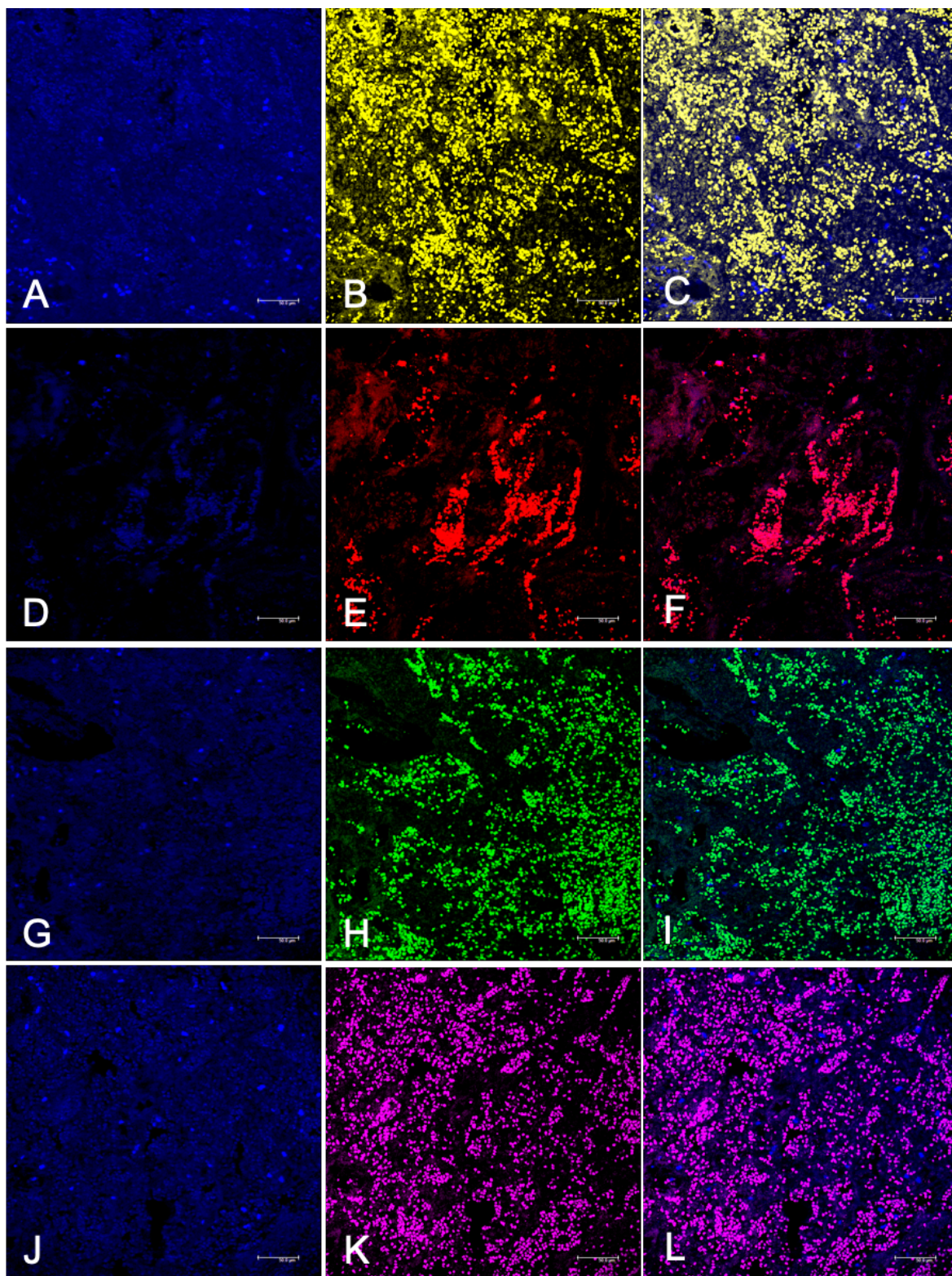


Figura 4. Imunofluorescência do tumor de mama metastático de cadela. Coloração com DAP-I (A, D, G e J) coloração com FITC (B, E, H e K) e Merge (C, F, I e L). Expressão positiva para as proteínas *PTEN* (C), *mTOR* (F), *AKT* (I) e *4EBP1* (L).

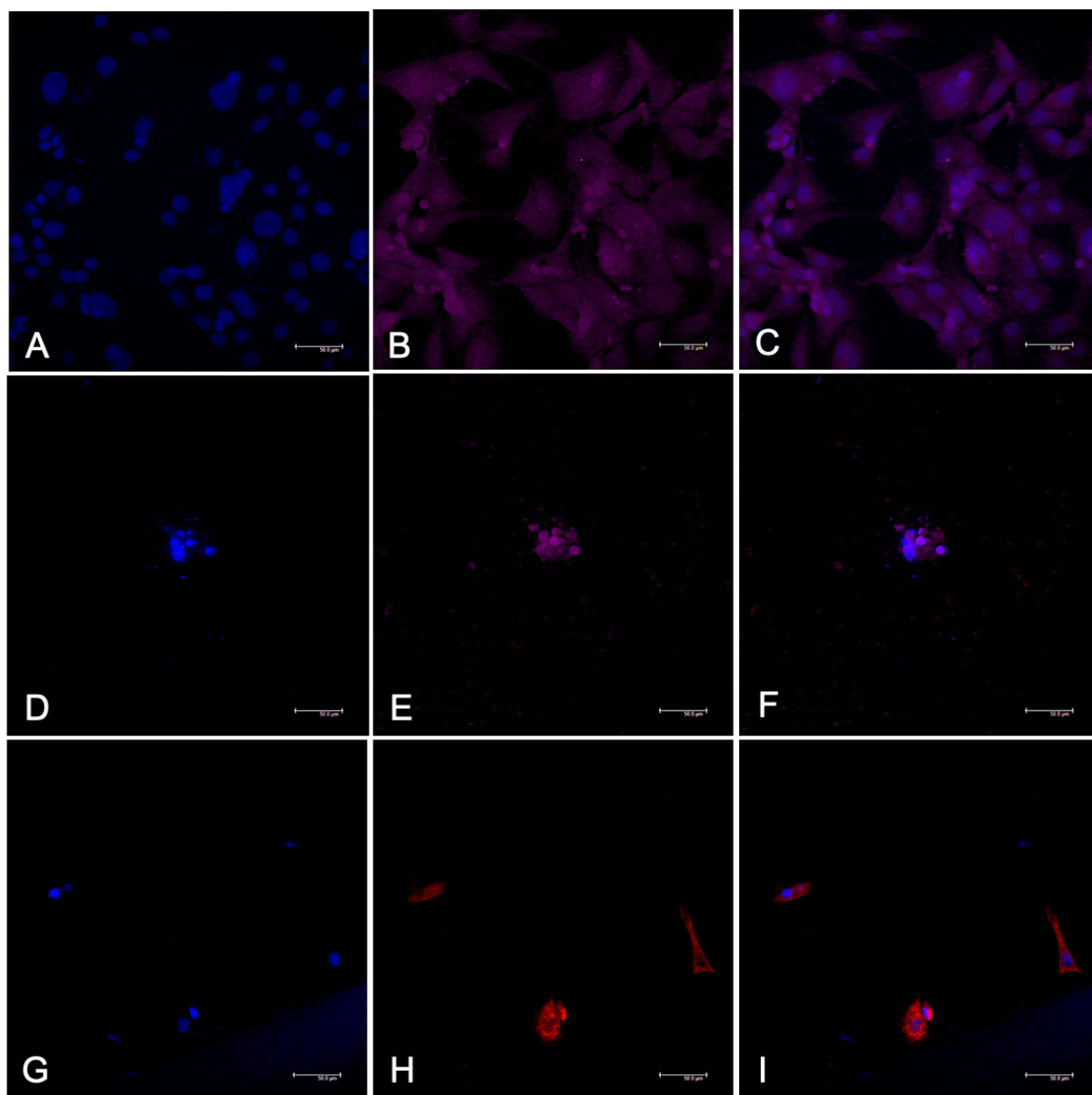


Figura 5. Imunofluorescência das células primárias e metastáticas de tumor de mama. Coloração com DAPI (A, D e G), coloração com FITC (B, E e H) e Merge (C, F e I). Expressão positiva para citoqueratina em células cultivadas *in vitro* de tumor mamário primário (C) e em tumor mamário metastático (F), e expressão positiva para vimentina em células cultivadas *in vitro* de tumor mamário primário (I).

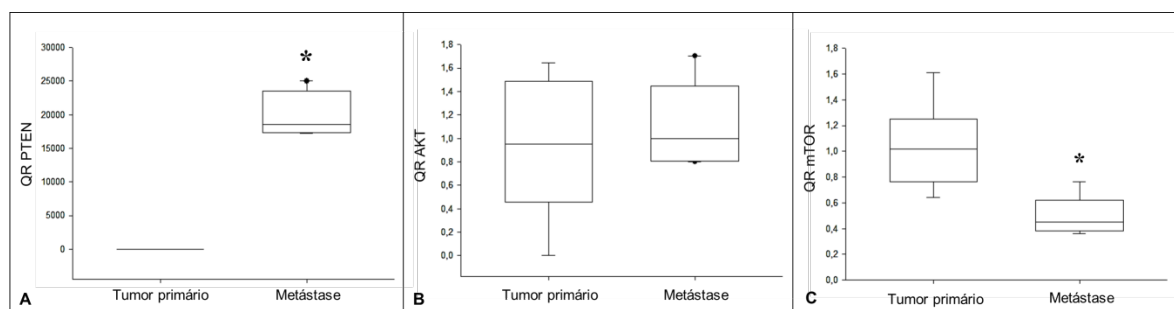


Figura 6. Resultados da qPCR para a expressão dos genes *PTEN*, *AKT* e *mTOR* nas células dos tumores primários e suas metástases cultivadas *in vitro*. Símbolo (*) indica diferença estatística ($P < 0,0001$).

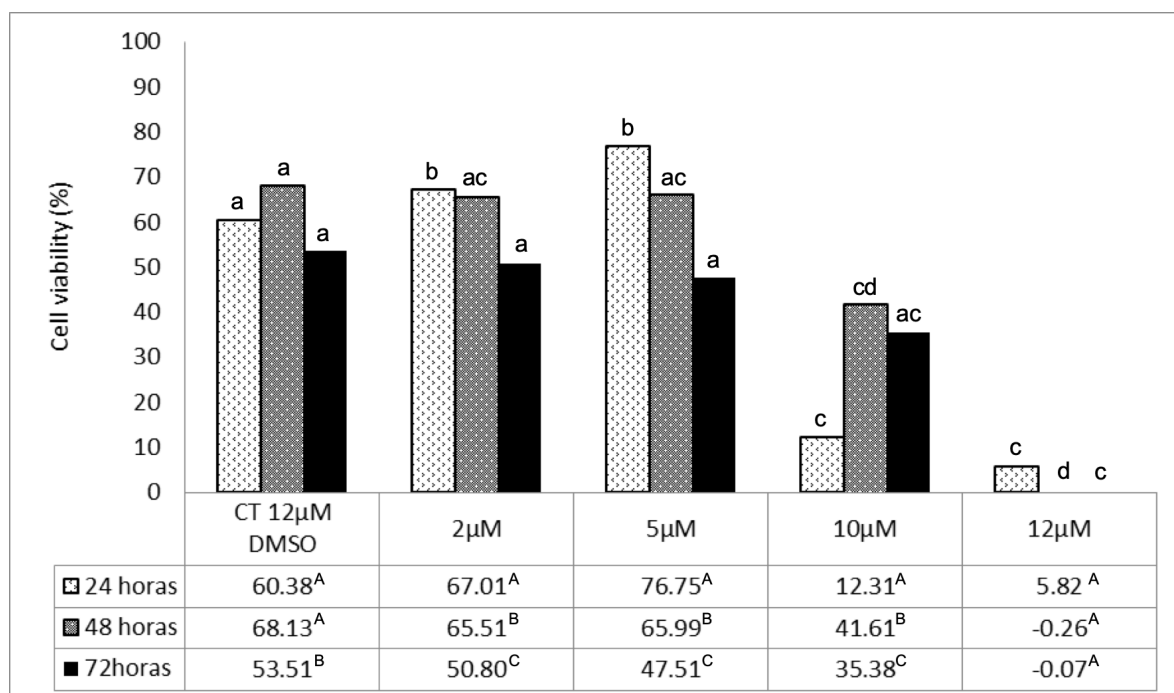


Figura 7. Porcentagem da viabilidade celular, no ensaio MTT da amostra tratada com rapamicina a 2, 5, 10 e 12 µM, durante 24, 48 e 72 h. Cultivo de células de carcinoma adenoescamoso. Letras minúsculas diferentes nas barras do gráfico indicam diferença estatística entre as concentrações de rapamicina no mesmo tempo. Letras maiúsculas diferentes na coluna do rótulo de dados indicam diferença estatística entre os tempos no mesmo tratamento.

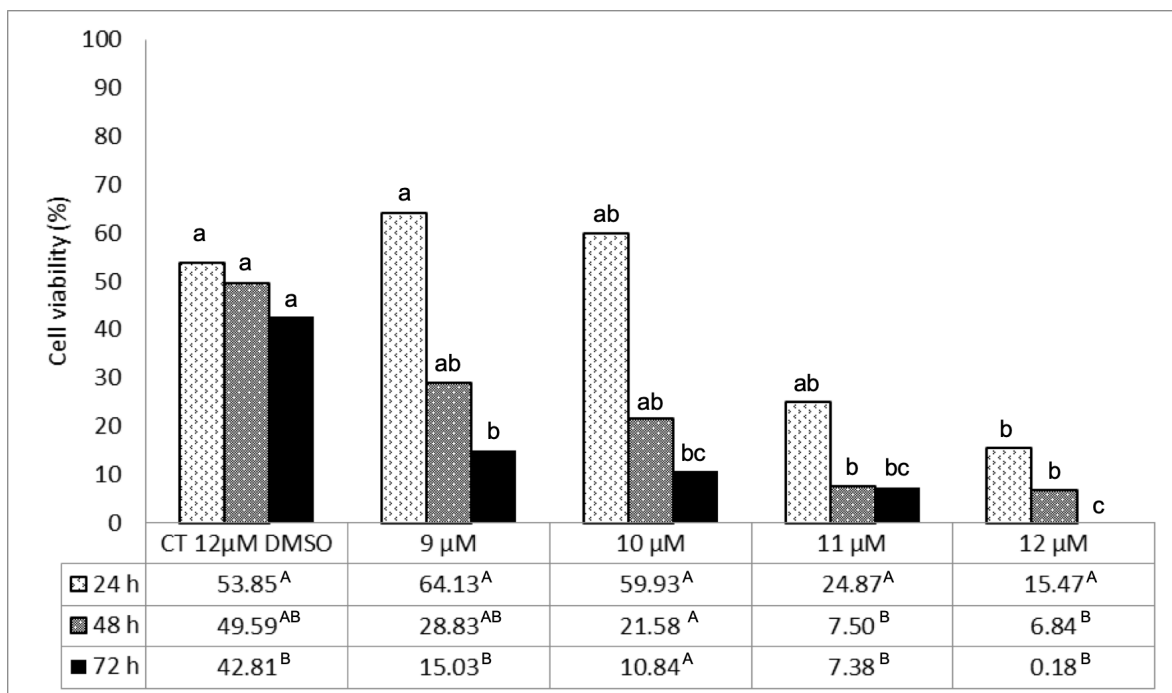


Figura 8. Porcentagem da viabilidade celular, no ensaio MTT da amostra tratada com rapamicina a 9, 10, 11 e 12 µM, durante 24, 48 e 72 h. Cultivo de células de carcinoma adenoescamoso metastático. Letras minúsculas diferentes nas barras do gráfico indicam diferença estatística entre as concentrações de rapamicina no mesmo tempo. Letras maiúsculas diferentes na coluna do rótulo de dados indicam diferença estatística entre os tempos no mesmo tratamento.

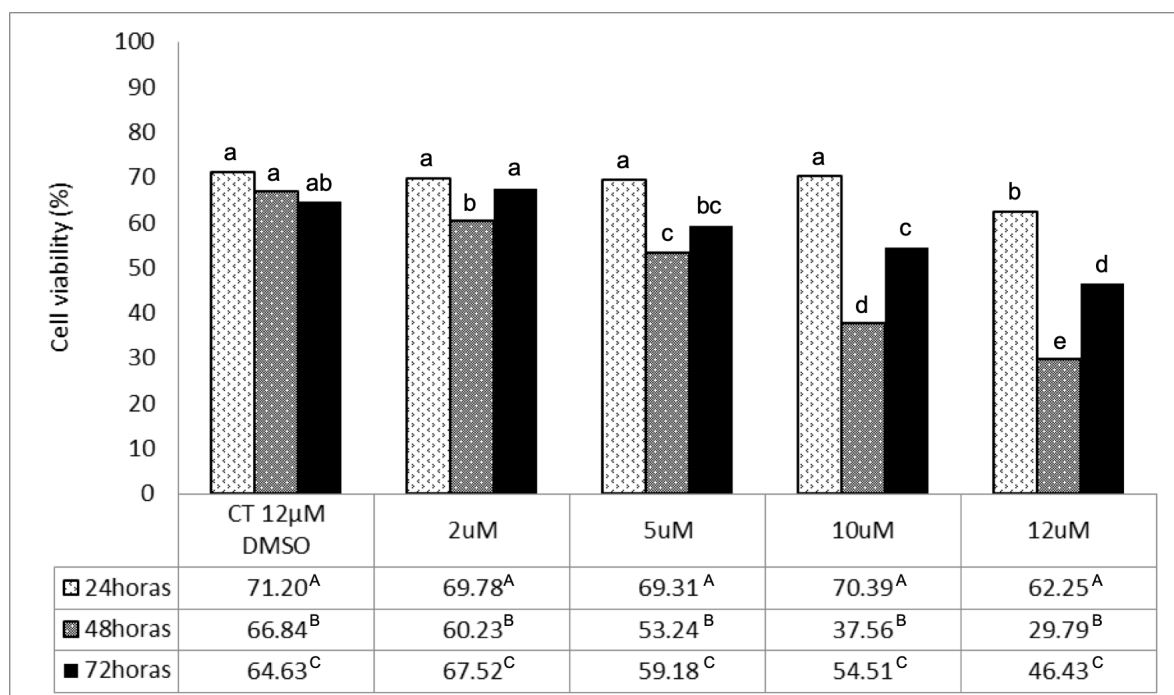


Figura 9. Porcentagem da viabilidade celular, no ensaio MTT da amostra tratada com rapamicina a 2, 5, 10 e 12 µM, durante 24, 48 e 72 h. Cultivo de células de carcinoma sólido grau III. Letras minúsculas diferentes nas barras do gráfico indicam diferença estatística entre as concentrações de rapamicina no mesmo tempo. Letras maiúsculas diferentes na coluna do rótulo de dados indicam diferença estatística entre os tempos no mesmo tratamento.

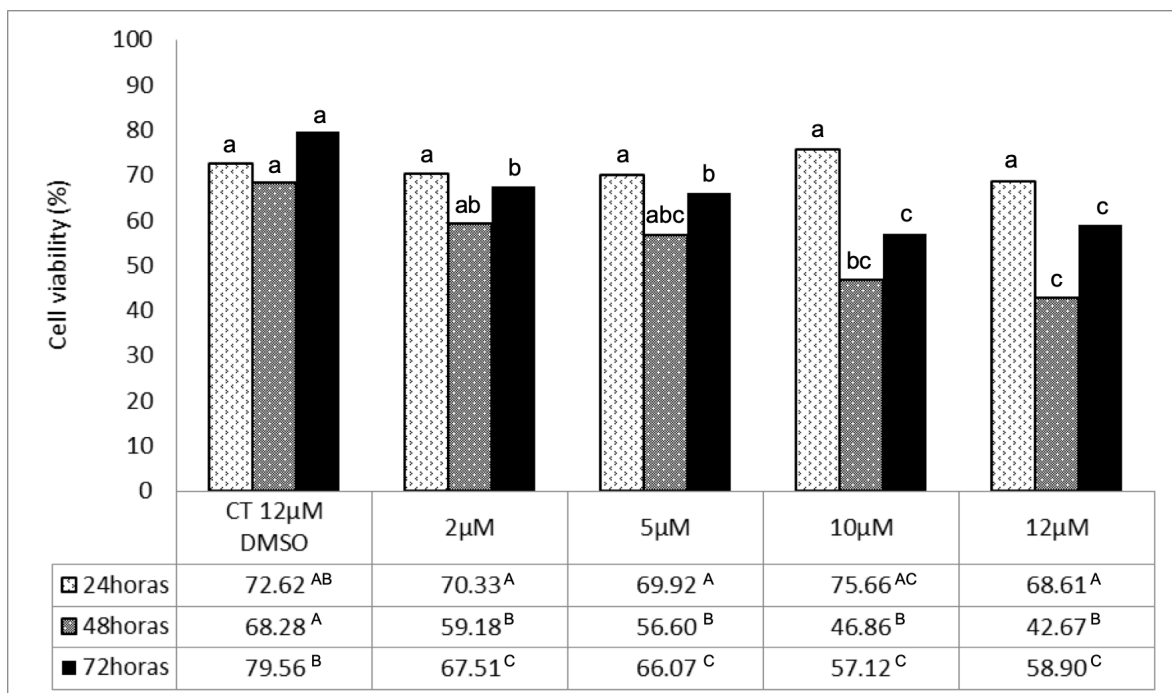


Figura 10. Porcentagem da viabilidade celular, no ensaio MTT da amostra tratada com rapamicina a 9, 10, 11 e 12 μ M, durante 24, 48 e 72 h. Cultivo de células de carcinoma sólido grau III metástico. Letras minúsculas diferentes nas barras do gráfico indicam diferença estatística entre as concentrações de rapamicina no mesmo tempo. Letras maiúsculas diferentes na coluna do rótulo de dados indicam diferença estatística entre os tempos no mesmo tratamento.