

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**Desenvolvimento do cultivo 3D a partir de células
primárias de neoplasias mamárias caninas. Estudo da
apoptose sobre efeito ou não da carboplatina.**

Daniela Stockmann Silva

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**Desenvolvimento do cultivo 3D a partir de células
primárias de neoplasias mamárias caninas. Estudo da
apoptose sobre efeito ou não da carboplatina.**

Daniela Stockmann Silva

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

Co-orientadora: Prof^a. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica)

ARAÇATUBA – SP

2014

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Stockmann, Daniela

S586d

Desenvolvimento do cultivo 3D a partir de células primárias de neoplasias mamárias caninas. Estudo da apoptose sobre efeito ou não da carboplatina / Daniela Stockmann Silva. -- Araçatuba: [s.n], 2014. 00 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Prof. Adjunto Alexandre Lima de Andrade

Co-orientadora: Prof^a. Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Técnicas de culturas celulares 2. Neoplasias Mamárias - cães. 3. Apoptose. 4 Quimioterapia I. T.

CDD 616.02774



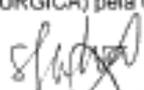
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Desenvolvimento de cultivo 3D a partir de células primárias de neoplasias
mamárias caninas. Estudo da apoptose sob efeito ou não da carboplatina.

AUTORA: DANIELA STOCHMANN SILVA

ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. CAMILA DA SILVA FRADE


Dra. MARIA GISELA LARANJEIRA


Dra. DEBORA APARECIDA PIRES DE CAMPOS ZUCCARI


Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO


Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

DATA DA REALIZAÇÃO: 8 de agosto de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANIELA STOCHMANN SILVA - nascida em 10 de novembro de 1976 no município de São Paulo - SP, cursou o ensino médio no Colégio Singular-Anglo de Santo André – SP. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Anhembi Morumbi – SP em 2003 e formou-se em 2008. Durante a graduação participou de estágios nas áreas de Anestesiologia, Inspeção de Alimentos e Patologia Clínica. Realizou mestrado em Ciência Animal na UNESP-Araçatuba com a obtenção do título de mestre em 2010. Iniciou o curso de doutorado em Ciência Animal na UNESP-Araçatuba, no ano de 2012, com ênfase na área de Oncologia Veterinária

EPÍGRAFE

“Eu aprendi...
...que ignorar os fatos não os altera;

Eu aprendi...
...que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas
esta permitindo que essa pessoa continue a magoar você;

Eu aprendi...
...que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

Eu aprendi...
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa
pessoa;

Eu aprendi...
...que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi...
...que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai
aproveitar as que você perdeu.

Eu aprendi...
...que quando o ancoradouro se torna amargo a felicidade
vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi...
...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher
o que fazer a respeito;

Eu aprendi...
...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda
felicidade e crescimento ocorre quando você está escalando-
a;

Eu aprendi...
...que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo
fazer.”

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao MÁRCIO, por perdoar minha ausência nesse período do doutorado, pelo amor, carinho, pelas palavras reconfortantes quando necessário. Por acreditar em mim e nunca sair do meu lado. Não existem palavras que possam expressar toda a minha gratidão e meu amor.

Agradeço ao meu PAI, por decidir ficar do meu lado, por me apoiar e por me amar.

Também agradeço ao HENRIQUE e EDILSON, vocês são mais que meus amigos, os considero como minha família.

Agradeço ao meu orientador PROFESSOR ALEXANDRE, pela oportunidade de realizar o doutorado, pelo incentivo, credibilidade, exemplo profissional, por sempre me ajudar com a parte escrita do projeto e com os relatórios.

Agradeço a PROFESSORA TEREZA CRISTINA, por abrir as portas do seu laboratório para os experimentos, assim como a dedicação do seu tempo para auxiliar com o cultivo de células, PCR, pelas ideias inovadoras e por acreditar.

Agradeço a PROFESSORA MARIA CECÍLIA, por transferir sua vaga de doutorado para que eu pudesse realizar meu projeto junto com Professor Alexandre. Pelo exemplo profissional, de honestidade, dedicação à pesquisa e ao ensino. Jamais esquecerei toda a ajuda quanto estava no Mestrado e todo o conhecimento que me ajudou a conquistar durante esse período. Minha sincera gratidão.

Agradeço à minha amiga SILMARA por toda a ajuda com a parte de experimentação, por ter passado seu conhecimento com o cultivo celular e permitir que eu a auxiliasse com sua pesquisa. Também agradeço pela sua amizade, exemplo profissional, de amor e dedicação à profissão, sem dúvida, trouxe grande contribuição ao meu doutorado. Agradeço também a imensa colaboração com a participação na banca de qualificação.

Agradeço ao HEITOR pela contribuição com a análise histopatológica das amostras de tumor de mama e pela amizade

Agradeço aos meu AMIGO Augusto, pela companhia, convivência, paciência, conversas, e risadas, tornado meus dias mais felizes, mesmo com as dificuldades do doutorado.

Aos meus amigos Bia, Carol, Arieli, Juliana, Lucas, Talita, Juliana Novais, Karina, obrigada por compartilharem momentos tão especiais, pela ajuda em algumas fazes do experimento, pela companhia e amizade.

Agradeço a KRICA, BELA, THI, SOFIA, CECEE E SOKIE, pela companhia e amor incondicional.

Gostaria de agradecer a UNIVERSIDADE UNESP, por ter disponibilizado toda a estrutura física para a realização dos projetos no mestrado e doutorado.

Agradeço a técnica do LABORATÓRIO DE VIROLOGIA Cilene e todos os técnicos e funcionários que trabalham para manter o ambiente de trabalho um local agradável.

Às funcionárias da BIBLIOTECA Fátima e Isabel pelas correções bibliográficas. E a Michele pela paciência, e ajuda com os xérox e encadernações.

Agradeço a ADRIANA por toda sua dedicação, carinho, bom humor e por sempre estar disposta e nos ajudar com palavras de otimismo.

Agradeço aos funcionários da PÓS-GRADUAÇÃO, principalmente a Isabela e Joelmir, por esclarecer as dúvidas, auxiliar com os prazos.

Agradeço a FAPESP pelo auxílio financeiro.

Gostaria de agradecer também a TODOS que por algum motivo não citei mas que participaram direta ou indiretamente de meu projeto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	14
II REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Glândula mamária em cães	16
2.2 Neoplasia de glândula mamária em cadelas	16
2.3 Modelos de cultivo celular.....	18
2.4 Esferoides em ensaios quimioterápicos	20
2.5 Apoptose.....	21
2.5.1 A proteína p53	22
2.5.2 O controle da apoptose pela família Bcl-2	23
2.6 Esquema: regulação da apoptose - ativação e inibição	24
III OBJETIVOS	25
IV MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Amostras.....	26
4.2 Preparo das amostras para o cultivo em monocamada aderentes.....	26
4.3 Diferenciação em células epiteliais.....	27
4.4 Imunofluorescência Indireta para avaliação dos marcadores p53.....	28
4.5 Cultivo Tridimensional (3D) e formação de esferoides.....	28
4.6 Ensaios Quimioterápicos do Cultivo 3D	30
4.7 Imunocitoquímica para p53.....	31
4.8 Análise Molecular para a expressão dos genes Bcl-2, Bax, caspase 2, caspase3, caspase 8 e caspase 9	32
4.8.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA).....	32
4.8.2 Avaliação da expressão genica dos genes alvo.....	34
4.9 Análise Estatística.....	35
V RESULTADOS.....	36
5.1 Estadiamento Clínico e Análise Histopatológica	36
5.2 Cultivo das células dos tumores de mama em monocamada de BP até AP.....	40
5.3 Imunofluorescência Indireta (IF) para a p53 no cultivo em monocamada em BP e AP p63	40

5.4 Histopatológico do cultivo 3D – BP e AP	44
5.5 Avaliação da expressão dos marcadores para a imunocitoquímica (IC)	46
5.6 Análise da expressão da p53 para imunocitoquímica (IC) nos Cultivos de BP e AP..	50
5.7 Análise molecular para os marcadores de apoptose no cultivo 3D em BP.	53
VI DISCUSSÃO.....	58
VII CONCLUSÃO.....	66
VIII REFERÊNCIAS	67
IX APÊNDICE	67

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Ilustração esquemática das vias reguladores da apoptose.....24
- FIGURA 2- Ilustração da metodologia do cultivo 3D: I- esquema dos poços do cultivo 3D com o AlgiMatrix™; II- Adição das células no cultivo (BP e AP); III- formação dos esferoides; IV- placa com 6 poços do kit AlgiMatrix™, onde as células do cultivo em monocamada foram adicionadas para a formação dos esferoides; V- Microscópio de Luz invertida utilizado para a visualização dos esferoides (Olympus IX 70), para visualizar a formação e crescimento dos esferoides; VI- Esferoides formados (20x).....29
- FIGURA 3- Ilustração da inclusão do gel do cultivo 3D no álcool 70% para o processamento histopatológico.....31
- FIGURA 4- Fotomicrografia do cultivo em monocamada de células de neoplasia de mama em cadelas. (A) Em maior aumento observa-se células com morfologia mesenquimal (*) e células com crescimento epitelial (#) 100x. (B) Formação de tapete único de células epiteliais (Obj. 40x).....41
- FIGURA 5 - Número de amostras de acordo com o tipo histológico e respectivo grupo de cultivo.....41
- FIGURA 6- Fotomicrografia da IFI dos cultivos em monocamada, estão mostrando as marcações para p53 onde A e C são do grupo BP e B e D são do grupo AP. As células possuem os núcleos com a cor azul e quanto a marcação é positiva o citoplasma apresenta a cor verde fluorescente (A, C e D Obj.100X; B Obj. 40X) (Cromógeno - FITC).....45
- FIGURA 7- Fotomicrografias dos cultivos celulares em AP, onde, em **A, B, C, D e E** podem ser observados grupos de células neoplásicas representando os esferoides formados durante o cultivo 3D H.E. 100x. As fotomicrografias **F, G, H, I, J** correspondem aos cortes histológicos de cada amostra do grupo AP. F,H,J H.E. 10x e G H.E. 40x48
- FIGURA 8- Fotomicrografias dos cultivos em 3D – BP, **A, B, C, D e E**, correspondem as amostras controle e **F, G, H, I, J** amostras carboplatina.....49
- FIGURA 9- Fotomicrografia da área dos esferoides provenientes do cultivo 3D que foram submetidos ao tratamento com carboplatina por 24h, 48h e 72h e seus respectivos controles (Obj. 40x). (*)detalhe da medição da área dos esferoides. Os dados foram processados com o sistema de análise de imagem, software AxioVision 4.8.3 (Carl Zeiss®).....49
- FIGURA 10- Ação da carboplatina em relação á area dos esferóides no cultivo 3D durante 24, 48 e 72 horas de tratamento.....49

FIGURA 11- Ação da carboplatina em relação á quantidade dos esferóides no cultivo 3D durante 24,48 e 72 horas de tratamento.....	49
FIGURA 12- Fotomicrografias da imunocitoquímica dos cultivos em 3D onde A e B são “BP” e C e D são “AP”, As células quando positivas apresentam citoplasma corado de marrom (Cromógeno - DAB) (Obj. 100x).....	52
FIGURA 13- Valores e perfil da expressão dos genes caspase 2, caspase 3, caspase 8, caspase 9, Bcl-2 e Bax, nas amostras do cultivo 3D de neoplasias mamárias de cadelas submetidas ao tratamento com carboplatina e respectivos controles.....	55
...	
FIGURA 14- Perfil da expressão de caspase 2, caspase 3, caspase 8, caspase 9, Bcl-2 e Bax, com relação ao tipo de neoplasia.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpo utilizado na imunocitoquímica e Imunofluorescência, clone, fabricante e diluição.....	32
Tabela 2 - Genes de codificação para as proteínas envolvidas na regulação da apoptose e as seus correspondentes conjuntos de sondas.....	35
Tabela 3 - Apresentação das amostras de tumorais mamárias de acordo com a raça, idade, estadiamento clínico, tipo histológico e grau histológico (OWEN, 1980).....	39
Tabela 4 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da <i>frequência</i> em porcentagem, segundo a Imunofluorescência para p53 no cultivo de monocamada em BP e AP.....	42
Tabela 5 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) com relação a <i>intensidade</i> imunomarcção para p53 no cultivo em monocamada em BP e AP.	42
Tabela 6 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da área e quantidade de esferoides em amostras controle e tratadas com carboplatina.....	50
Tabela 7 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da <i>frequência</i> em porcentagem, segundo a imunocitoquímica para p53 no cultivo 3D em BP e AP.....	51
Tabela 8 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade em escores, segundo a imunocitoquímica para p53 no cultivo 3D em BP e AP.....	51
Tabela 9 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da frequência em porcentagem, segundo o método utilizado para p53 no cultivo em monocamada e em 3D.....	53
Tabela 10 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade em escores, segundo o método utilizado para p53 nos tumores mamários em AP e BP.....	53
Tabela 11 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (cv) da expressão dos genes alvo em amostras de BP antes e após o tratamento com carboplatina.....	57

Desenvolvimento do cultivo 3D a partir de células primárias de neoplasias mamárias caninas. Estudo da apoptose sobre efeito ou não da carboplatina.

RESUMO - Em medicina veterinária, os tumores mamários de cadelas possuem alta casuística e o seu prognóstico, em muitos casos, já desfavorável. Dessa forma, é imperioso desenvolver formas eficientes para estudar o comportamento dessa neoplasia, utilizando cultivos celulares para aplicação de testes quimioterápicos associados à expressão de indutores da apoptose. Assim o objetivo desse estudo foi realizar o cultivo, em 3D, de tumores mamários, mimetizando o ambiente tumoral “in vivo”, em substituição aos testes experimentais com animais e cobaias de laboratório. Adicionalmente, pretendeu-se analisar a expressão das proteínas caspase 2, 3, 8, 9, Bcl-2 e Bax em células após o tratamento com carboplatina (dose 1,25 μ M), e a p53 em cultivo monocamada em células de baixa e alta passagem (20 até 58, respectivamente). O cultivo em 3D demonstrou ser uma boa ferramenta para o estudo “in vitro”. Os esferoides formados diminuíram de tamanho após tratamento com carboplatina. A expressão de Bcl-2, em duas amostras, indicou resistência à carboplatina em dois tipos histológicos (carcinoma sólido e carcinoma espinocelular). As caspases 2 e 3 não foram expressas em amostras tratadas, indicando que a carboplatina não causa morte celular pela apoptose. A p53 foi marcada no núcleo e no citoplasma, indicando anormalidade nessa proteína, que pode estar associada à progressão maligna em neoplasias. Todos os ensaios desenvolvidos no cultivo 3D mostraram que é possível, com essa técnica, aprofundar os estudos sobre as neoplasias mamárias em cães, podendo contribuir para novas descobertas referente ao prognóstico e novos tratamentos.

Palavras-chave: Técnicas de culturas celulares, Neoplasias Mamárias – cães, Apoptose, Quimioterapia

Development of 3D culture of primary cells from canine mammary tumors. Study of the effect of carboplatin during apoptosis.

SUMMARY - In Veterinary Medicine canine mammary tumors have high casuistry and in many cases bad prognosis the prognosis is bad. Thus it is imperative to develop efficient ways to study the behavior of this tumor using tissue culture tests for applying chemotherapeutic associated with expression inducers of apoptosis. The aim of this study was to grow cells of breast tumors in 3D culture where can mimic the environment "in vivo". Additionally, analyze the expression of the caspase protein 2, 3, 8, 9, Bcl-2 and Bax and cells after treatment with carboplatin (dose 1.25 mM). Thus, analyse of p53 cells in monolayer culture in high-pass (up to 58 passages) and low-pass (up to 20 passages). The spheroids formed decreased in size after treatment with carboplatin. The expression of Bcl-2 in both samples showed resistance to carboplatin in two histological types (solid carcinoma and squamous cell carcinoma). The caspase 2 and 3 not expressed in treated samples indicating that carboplatin does not cause cell death by apoptosis. P53 showed cytoplasmic and in the nucleus, indicating that abnormal protein may be associated with malignant progression in cancer. All assays developed in 3D culture showed that it is possible with this technique, further studies on mammary tumors in dogs that can contribute on new discoveries regarding the prognosis and treatments.

Keyword: 3D Culture, Canine Mammary tumor, apoptosis, chemotherapy

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As neoplasias são enfermidades comuns em cães e são a principal causa de morte em animais idosos (BENTUBO et al., 2007). Tal fato pode estar atrelado ao aumento da longevidade dos animais de companhia nos últimos tempos, sendo decorrente do desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de prevenção de doenças infecciosas e parasitárias, nutrição, terapêutica e prática médica (WITHROW, 2007).

Os tumores mamários acometem tanto cães, como humanos, representando 50% de todas as neoplasias malignas e benignas nos cães (SORENMO, 2003; HELLMEN, 2005).

A semelhança compartilhada entre as neoplasias em cadelas é grande, abrangendo aspectos epidemiológicos, morfológicos e clínicos, assim como pelas características histopatológicas e comportamento biológico. Por esse motivo, é possível utilizar modelos caninos para o estudo da biologia do câncer, como também para testes com agentes terapêuticos (SORENMO, 2003). Semelhanças moleculares, também, já foram detectadas em alterações na expressão de proteínas associadas à proliferação celular, apoptose e diferenciação celular e mutações em genes, incluindo BRCA1, BRCA2, c-erB-2 e p53 (KUMARAGURUPARAN et al., 2005)

As neoplasias mamárias em cadelas são consideradas ideais para a avaliação comparativa dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese (SORENMO, 2003). Porém, o uso de modelos animais ou humanos em experimentos é, muitas vezes, limitado devido a vários fatores como disponibilidade de animais, viabilidade dos procedimentos nos testes e, também, pelas preocupações éticas sobre o desconforto ou dor que pode causar ao animal ou ao homem. O uso de tecidos de cadáveres poderia ser uma alternativa, porém, não é indicado, pois os mesmos podem carrear outras doenças ou variações genéticas, que podem influenciar o resultado de estudos, principalmente, aqueles relacionados aos testes com fármacos quimioterápicos

(NELSON et al., 2005; GRIFFITH et al., 2006; MIKOS et al., 2006; SNIADOCKI et al., 2006; YAMADA et al., 2007).

Tais limitações favorecem a escolha de modelos “in vitro” para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos na formação das neoplasias, testes com fármacos com a finalidade de estabelecerem doses ou mesmo, para a descoberta de novas substâncias (ELLIOTT et al., 2011).

Os modelos de estudo “in vitro” podem ser controlados, diminuindo-se a possibilidade de erros durante o experimento, além de serem, geralmente, menos dispendiosos. Outras vantagens apontam pela rapidez na busca de resultados, comparativamente aos modelos animais, além de permitirem o estudo de um número maior de combinações, com diferentes parâmetros (NEWSAM et al., 2005).

O método de cultivo em três dimensões (3D) é muito eficiente quando comparado aos modelos em monocamadas, ou seja, em duas dimensões (2D). O mesmo pode proporcionar um microambiente celular semelhante ao microambiente observado nos tecidos vivos. Esta característica possibilita que as informações obtidas sejam mais próximas da realidade, diminuindo, assim, possíveis erros de interpretações, o que é fundamental nos testes utilizando fármacos quimioterápicos, estímulos ambientais, estudo de comportamento e funções celulares, além dos eventos moleculares envolvidos, como a expressão de genes, fosforilação/desfosforilação de proteínas, entre outros (NELSON et al., 2005; GRIFFITH et al., 2006; MIKOS et al., 2006; SNIADOCKI et al., 2006; YAMADA et al., 2007). Outra vantagem deste método é a formação do lúmen observado em neoplasias de mama e a possibilidade do uso em co-cultivo de diferentes linhagens de células, como por exemplo, adicionar fibroblastos, células endoteliais e do sistema imune com células neoplásicas, permitindo, assim compreender a interação estroma-parênquima (FEDER-MENGUS et al., 2008; MORALES et al., 2009; PIETRAS et al., 2010).

Pela elevada incidência das neoplasias de mama em cadelas, ressalta-se que o tema requer novas e originais investigações. Justificam-se a condução de pesquisas voltadas ao melhor entendimento da biologia molecular dos tumores,

bem como, a descoberta de novos fármacos quimioterápicos e sua eficiência na promoção da morte de células tumorais. Assim, o principal objetivo desse trabalho foi o de estabelecer uma padronização da técnica “in vitro” pelo do cultivo em 3D para que, futuramente, possa ser um modelo para a realização de estudos versando sobre avaliações da eficiência ou resistência de fármacos, mecanismos de interação célula-célula, célula e o microambiente, fatores de crescimento, assim como acompanhar e compreender os fatores regulatórios relacionados à interação estroma-parênquima e a morfogênese luminal.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neoplasia de Glândula mamária em cadelas

A neoplasia de glândula mamária é a afecção mais comum entre os mamíferos, sendo que a espécie canina é uma das mais acometidas. Existem vários tipos histológicos que classificam a neoplasia de mama em cães, tornando-a conhecida por sua heterogeneidade (KARAYANNOPOULOU et al., 2001; SIMON et al., 2006).

Entre os fatores de risco que contribuem para o aumento de cães afetados por essa neoplasia citam-se: a idade avançada, cadelas não castradas, nulíparas, ciclo estral irregular, obesidade em cadelas jovens, hiperplasia endometrial cística, dieta rica em carne bovina ou suína e o uso da progesterona no tratamento de outras afecções (PEREZ et al., 2000). O diagnóstico inclui a história clínica e de um exame físico completos do animal. Os cães com tumores da glândula mamária em estágios avançados ou com carcinomas inflamatórios apresentam-se, clinicamente, doentes com alterações no hemograma, coagulopatias e metástases (MARCONATO et al., 2009). A citologia aspirativa pode ser realizada, inicialmente, na formação neoplásica para confirmar se é uma neoplasia maligna ou benigna e também nos linfonodos para verificar presença de metástases. Porém, o padrão ouro para o diagnóstico e classificação tumor de glândula mamária é o exame histopatológico e a classificação realizado de acordo com o sistema TNM (tumor, linfonodo,

metástase). Portanto, para o diagnóstico completo de um cão com neoplasia mamária, são necessárias informações sobre o tamanho do tumor, alterações em linfonodo e presença de metástases (SORENMO et al., 2011).

A taxa de malignidade das neoplasias da glândula mamária em cadelas varia entre 41% e 53% nos animais acometidos (KARAYANNOPOULOU et al., 2001; CASSALI et al., 2011). O seu comportamento invasivo pode ser variável, com rápida ocorrência de metástases ou com desenvolvimento lento, que pode perdurar por alguns anos para a disseminação em órgãos viscerais (KIM et al., 2004). As metástases constituí na causa de morte mais comum em animais, e pode ocorrer em aproximadamente 50% dos casos. Acredita-se que em algum momento durante a progressão do tumor mamário, haja perda do controle dos mecanismos do ciclo celular das células tumorais (KLOPFLEISCH et al, 2009; KLOPFLEISCH et al, 2010). Sendo assim, estudos empregando a biologia molecular e técnicas de clonagem de DNA ainda são conduzidos na tentativa de esclarecer os mecanismos da carcinogênese dessa neoplasia (KLOPFLEISCH et al, 2010). Com os avanços das técnicas no estudo dos tumores, é possível obter um melhor entendimento dos eventos celulares que ocorrem durante a transformação maligna, apesar da sua complexidade. Com isto, a elaboração de novas terapias é necessária com o intuito de melhorar o prognóstico para os pacientes (KLOPFLEISCH et al, 2010).

O tratamento de eleição para essa neoplasia é o cirúrgico, exceto nos casos onde há presença de metástase avançada ou em carcinomas inflamatórios. (SMITH et al.,1984; KARAYANNOPOULOU et al., 2001; SIMON et al., 2006).

A quimioterapia pode ser realizada em casos de metástases ou no pós-operatório. Os fármacos comumente utilizados são a ciclofosfamida e a doxorrubicina. Porém, como o tumor mamário em cadelas possui grande heterogeneidade, torna-se difícil prever a sensibilidade ao quimioterápico em diferentes tipos histológicos. Outra característica que dificulta a escolha do fármaco é que nem sempre as metástases à distancia possuem a mesma característica do tumor primário (QUEIROGA e LOPES, 2002)

Apesar da comprovação de algumas teorias de que as neoplasias são resultantes de anomalias genéticas, principalmente aquelas relativas aos oncogenes e genes supressores de tumor, novos estudos são essenciais para a descoberta de novas vias e de moléculas que participam das transformações celulares, nesta doença, até a sua progressão maligna, que, quase sempre, culminam em metástase (KLOPFLEISCH et al, 2010).

2.2. Modelos de cultivo celular

O crescimento e a manutenção de qualquer tecido normal dependem de uma série de interações celulares em um microambiente contendo diferentes fatores de crescimento, hormônios e moléculas de adesão, assim como, uma complexa matriz molecular extracelular (KIM et al., 2004). Estudos anteriores sobre fisiologia da mama humana normal e do tumor de mama, foram significativamente prejudicados pelas limitações inerentes aos modelos experimentais quando avaliados em sistema de cultivo em monocamada ou bidimensional (2D) (KIM et al., 2004). Entre as principais limitações do cultivo 2D que desfavorecem um estudo aprofundado sobre a interação entre células, estão: 1) ausência de estroma, que no caso da glândula mamária constitui cerca de 80% de seu volume, quando em repouso; 2) a falta de arquitetura estrutural, que limita o transporte de substâncias entre células; e 3) alguns tipos de células epiteliais normais, que não são capazes de aderir e crescer em um substrato artificial, como no cultivo 2D. Além de todos esses fatores desfavoráveis, esse sistema de cultivo não fornece semelhança fisiológica com o ambiente de crescimento do tumor “in vivo” (KIM et al., 2004; LI & LU., 2011).

Os estudos investigativos sobre a biologia dos carcinomas mamários, torna-se necessário manter ou recriar uma arquitetura em 3D do tecido em cultura, com o intuito de mimetizar a interação de células tumorais com o estroma celular, como no ambiente “in vivo” (KIM et al., 2004).

Embora o modelo de cultivo em monocamada seja o mais utilizado em pesquisas oncológicas, principalmente aquelas relativas às neoplasias mamárias, devido a boa viabilidade que essas células apresentam nesse meio,

considera-se fundamental ampliar os estudos mimetizando o microambiente de um tecido intacto, o que é possível com um sistema de cultivo 3D (KIM et al., 2004).

A grande vantagem da utilização do cultivo 3D é permitir o estudo de mecanismos de sinalização intracelular e efeitos de agentes antitumorais em uma situação semelhante ao ambiente “in vivo”. Além de tratar de um procedimento simples e de baixo custo, quando comparado à complexidade de pesquisas com células no ambiente “in vivo” (YAMADA et al., 2007). Outra vantagem aponta para um crescimento celular em um ambiente 3D organizado e dependente de interações imediatas com células vizinhas e com a matriz extracelular (MEC). Os receptores de superfície das células ligam-se à proteínas no MEC e determinam sinais bioquímicos que, após serem interpretados, culminam em diferenciação, apoptose, proliferação ou invasão celular (PATEL et al., 2011).

As culturas em 3D podem ser importantes no estudo dos efeitos de quimioterápicos em diversas neoplasias e no desenvolvimento de um modelo experimental que permitirá a redução do uso de animais em pesquisas. Investir em estudos desta natureza pode resultar em melhoria da eficiência dos cultivos celulares, reduzindo-se os custos em pesquisa, além de permitir a identificação de novos fármacos, reduzindo o tempo de seu desenvolvimento pela indústria farmacêutica (PATEL et al., 2011).

As células, quando cultivadas no sistema 3D, formam estruturas denominadas de esferoides multicelulares. Os esferoides tumorais multicelulares são pequenos e constituídos de células e estroma. Eles apresentam em seu interior, uma heterogeneidade celular, com formação de microambiente e diferentes exposições a diversos constituintes como nutrientes e oxigênio. Pelo fato destas características mostrarem-se muito semelhantes aos tumores avasculares “in vivo”, a cultura de células 3D avançou em diversas linhas de pesquisa, tornando-se um modelo bastante utilizado em ensaios radiológicos e quimioterápicos (KIM et al., 2004).

2.3. Esferoides em ensaios quimioterápicos

A capacidade dos esferoides de simular um ambiente semelhante ao neoplásico “in vivo”, fez do cultivo 3D uma ferramenta importante para verificar a eficácia de diversos fármacos, além de permitir melhor compreensão dos mecanismos de interação celular (ELLIOTT et al., 2010). Em estudos anteriores, comprovou-se que, no cultivo em 3D, há elevada resistência aos fármacos quimioterápicos, proporcionando dados semelhantes aos observados no ambiente “in vivo”. O motivo provável dos mecanismos dessa resistência aos quimioterápicos pode estar relacionada à interação entre células, como também, às substâncias liberadas pelas células neoplásicas, como aquelas existentes nas neoplasias sólidas cultivadas “in vivo” (ELLIOTT et al., 2010).

O uso do cultivo 3D e a formação de esferoides possibilitaram uma maior compreensão da importância dos constituintes do meio extra-celular, dos receptores no microambiente de células neoplásicas e das vias de sinalização que operam predominantemente no sistema 3D e, com isso, novas terapias podem ser descobertas (KIM et al., 2004).

O controle do ciclo celular é um importante fator de crescimento nas neoplasias em geral, promovendo o desenvolvimento do tumor. Fármacos quimioterápicos, como a carboplatina, são capazes de interromper o ciclo celular e promover a morte de células, tornando-se uma ferramenta essencial ao tratamento de neoplasias (KELLAND, 2007).

A carboplatina é um agente quimioterápico derivado da platina, que foi desenvolvido com o objetivo de diminuir a toxicidade apresentada pela cisplatina (RANGEL et al., 2009). A sua ação inicia-se no DNA, porém o mecanismo de como ocorre o dano no material genético não é completamente compreendido (OTT et al., 2007). Em estudos recentes, avaliou-se a eficácia da carboplatina associada ao anti-inflamatório não esteroideal não seletivo ou Cox-1/Cox-2 para tratamento de carcinoma de glândulas mamárias, sendo demonstrado uma boa evolução clínica, sem recorrência, de metástases, além da sua fácil administração e melhoria considerável da vida do paciente, com mínimos efeitos colaterais (SOUZA et al, 2012; LAVALLE et al, 2012).

2.4. Apoptose

A morte celular programada, ou apoptose, é essencial para o desenvolvimento e homeostase dos tecidos. Mudanças no equilíbrio bioquímico induzem à inibição do programa de morte celular. A elucidação das vias que levam à apoptose torna-se assunto de interesse, que pode fornecer informações sobre resistência a fármacos, além de facilitar o desenvolvimento de novas terapias quimioterápicas (MOUBARAK et al., 2007).

A apoptose é caracterizada pela regulação morfológica como retração celular, contração da membrana plasmática, quebra nuclear e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (LUO et al., 1998). É um processo que também pode ser mediado por regulação bioquímica, com o envolvimento de mecanismos homeostáticos, não fisiológicos, com finalidade de reconhecimento, resposta e remoção celular, regulando, assim, os microambientes de tecidos normais ou neoplásicos (GREGORY et al., 2010).

A morte celular programada pode ser controlada por duas vias principais, a **via extrínseca**, também nomeada de via de receptor de morte celular, e a **via intrínseca** ou via mitocondrial, que depende do envolvimento de proteínas pertencentes à família Bcl-2, e que afetam a integridade da membrana externa mitocondrial (MEM) (KORSMEYER, et al., 1999). Ambas convergem com liberação de proteases de cisteína da família caspase, que são responsáveis pela execução da apoptose (HENGARTNER, et al., 2000; YING et al., 2007; GREGORY et al., 2011).

As células de carcinoma mamário sofrem inúmeros estímulos que podem desencadear em apoptose mas, de alguma forma, a morte celular pode ser evitada e as células continuam sua proliferação. Existe a hipótese de que ocorrem defeitos dos sistemas de vigilância celular como, por exemplo, nas respostas a danos no DNA ou na ativação de inibidores da apoptose ou, também, podem existir falhas na função de moléculas pró-apoptóticas. Estudos têm sido direcionados na hipótese de que existem defeitos nas vias que levam à apoptose de carcinomas mamários, pela análise de padrões de expressão de genes que

desencadeiam tais vias, associando, tal resposta, aos danos causados no DNA (KLOPFLEISCH et al., 2011).

Um dos principais reguladores envolvidos na fase inicial da indução da apoptose é a proteína supressora de tumor p53. Em casos severos de danos ao DNA, a p53 ativada acumula-se na célula interrompendo o ciclo celular, que pode ativar a resposta a danos no DNA ou induzir a apoptose. E esse processo ocorre pela via de ativação da proteína pró-apoptótica Bax (GASCO et al., 2002; DEGLI et al 2003). A ativação da Bax leva à apoptose, estando relacionada às caspases 8, 9 e a caspase efetora 3, sendo que, esta última, degrada a maioria das proteínas celulares (KLOPFLEISCH et al., 2011).

2.4.1. A proteína p53

Atualmente, o supressor de tumor e inibidor de crescimento celular melhor caracterizado é a proteína p53. Esta proteína pode ser ativada por vários fatores, como por exemplo, estresse oxidativo e danos ao DNA, que interrompem o ciclo celular levando à morte por senescência. A p53 bloqueia o ciclo celular mediada pelo aumento da transcrição da p21 que, por sua vez, inibe a ciclina E/Cdk2 na transição da *fase G1* para a *fase M* do ciclo celular. O impacto dos níveis de expressão da proteína p53 sobre a atividade funcional do carcinoma mamário constitui-se em tema de muitas pesquisas, mas sua relevância no prognóstico tumoral ainda é questionável (KLOPFLEISCH et al., 2011). A proteína p21 é expressa em carcinomas metastáticos em cães e o aumento de sua expressão em neoplasias de mama pode ser uma tentativa de induzir a p53 a inibir a progressão do ciclo celular, porém essa tentativa falha na maioria das células tumorais (KLOPFLEISCH et al., 2011).

A inativação da p53 não ocorre somente por mutação e supressão da p53, mas também pela interrupção das vias que regulam sua atividade proteica como, pela via da Mdm-2 (DEYOUNG et al, 2007). Estudos já demonstraram as interações entre as proteínas da família Bcl-2 com a proteína p53 (FIGURA 1); tais proteínas utilizam regiões do DNA no gene TP53 de maior similaridade entre os membros da família Bcl-2 (COLLAVIN et al., 2010). Segundo

Kumaraguruparan et al. (2006), o aumento da expressão da Bcl-2, geralmente está associada também a expressão da p53 mutante.

2.4.2. O controle da apoptose pela família Bcl-2

A família Bcl-2 é constituída por proteínas antiapoptóticas que possuem 4 homólogos com domínio BH (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1 (Bcl-2A1)) e pró-apoptóticas, Bax, Bak e Bok, que são divididas em três domínios BH (BH1, BH2 e BH3) e as Bim, Bad, Bik, Bmf, Bid, Noxa e Puma que possuem somente o domínio BH3 (ADANS et al., 2007). Os múltiplos domínios das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak são frequentemente solicitados no processo de apoptose (WEI et al., 2001). A Bax, inicialmente, permanece na forma inativa no citosol, mas pode se submeter a mudanças em sua conformação e migrar para a mitocôndria, quando há estímulos apoptóticos (BILLEN et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2004; HSU et al., 1997; WOLTER et al., 1997).

Existem dois modelos de ativação de Bax e Bak. Um modelo indireto, onde a Bax e a Bak devem estar sempre ligadas a proteínas antiapoptóticas para impedir sua ativação (WILLIS et al., 2005 ; WILLIS et al., 2007; CHIPUK et al., 2008; GAVATHIOTIS et al., 2008). Neste modelo, há sobrevivência da célula e toda proteína, Bax e Bak, deve estar vinculada a uma proteína antiapoptótica, como a Bcl-2 ou Mcl-1 (JOSLYN et al., 2009). O modelo direto de ativação da Bax e Bak, ocorre por proteínas ativadoras, tais como Bid, Bim, Puma e p53, que interagem e induzem mudanças na conformação de Bax e Bak (LOVELL et al., 2008).

A expressão da Bcl-2 ou de outras proteínas antiapoptóticas, incluindo Mcl-1, Bcl-X_L, Bcl-w e BFL-1, bloqueiam a morte celular em resposta a uma variedade de insultos, impedindo a ativação e homo-oligomerização de Bax e Bak (JOSLYN et al., 2009). As proteínas antiapoptóticas, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w e Bfl-1, ligam-se e sequestram as pró-apoptóticas incluindo as BH3, Bax e Bak, a fim de prevenir a apoptose. Proteínas sensibilizadoras provocam a apoptose por inibir essa interação (CERTO et al., 2006; CHEN et al., 2005; KUWANA et al., 2005; OPFERMAN et al., 2003).

Certas células neoplásicas dependem da Bcl-2 e de outras proteínas antiapoptóticas para sobreviverem (OLTERSDORF et al., 2005; TSE et al., 2008). Algumas terapias moleculares voltadas às proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, podem induzir a apoptose em células neoplásicas (JOSLYN et al., 2009).

2.5. Esquema: regulação da apoptose - ativação e inibição

Vias da apoptose mediada por: p53, Bax, Bcl-2 e caspases 2,3,8 e 9.

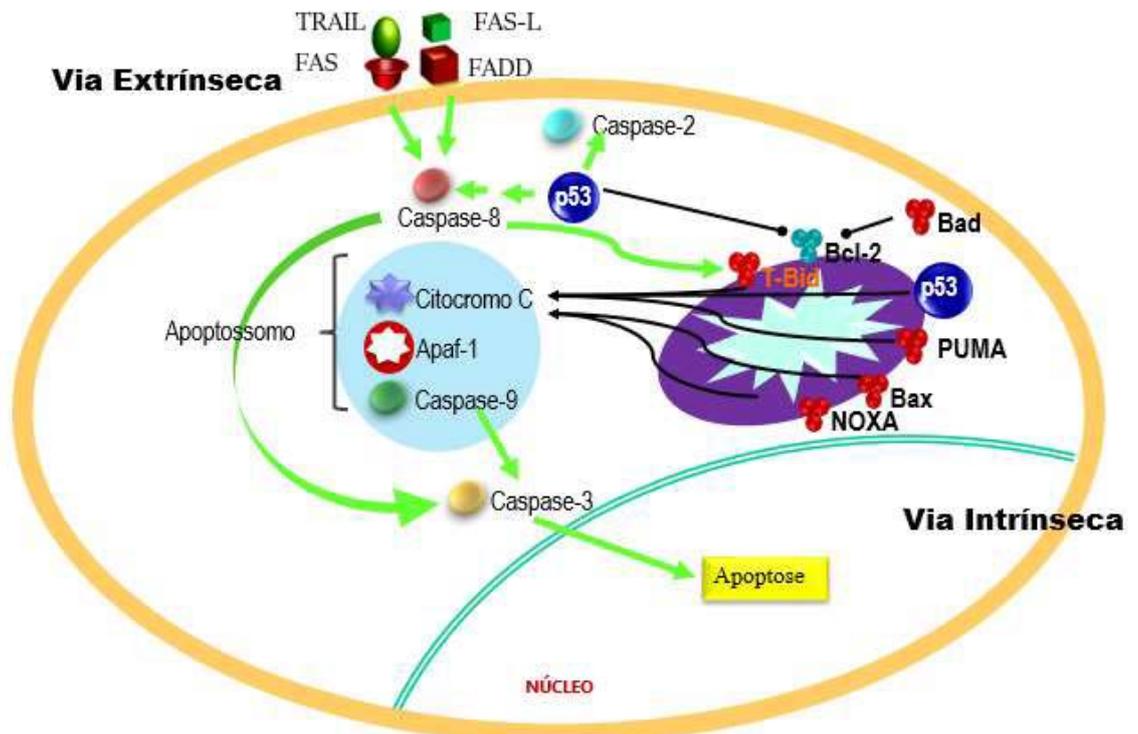


FIGURA 1 - Ilustração esquemática das vias reguladoras da apoptose.

III. OBJETIVOS

Frente ao contingente de informações técnicas sobre cultura de tumores e expressão de agentes pró e antiapoptóticos, é consenso que o estudo de novos aspectos sobre eles seja assunto que mereça novas e originais investigações. Com a pesquisa, pretendeu-se realizar ensaios “in vitro” com células de carcinoma de glândula mamária de cadelas, devido à alta ocorrência dessa neoplasia em animais da espécie canina, tendo-se por objetivos:

1. Estabelecer condições ideais de cultivo para neoplasias mamárias de cadelas, com técnica 3D;
2. Avaliar a atividade anti-neoplásica “in vitro” da carboplatina em cultivo 3D;
3. Analisar a exequibilidade das técnicas de Imunofluorescência (IF) e imunocitoquímica (IC) e moleculares em culturas em monocamada e em 3D;
4. Determinar o período em que ocorre a formação dos esferoides em cultivo 3D, a fim de possibilitar a realização de ensaios “in vitro” sobre os mecanismos envolvidos na carcinogênese.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso dos Animais (CEUA) e aprovado sob número de processo 02070-2011 (APÊNDICE).

4.1. Amostras

As amostras de neoplasias de mama, de aproximadamente 1-cm³ foram colhidas com os cuidados de assepsia e antissepsia rotineiros junto à rotina hospitalar do Hospital Veterinário da FMVA-UNESP de Araçatuba, durante os procedimentos cirúrgicos de mastectomia radical previamente determinados. Para a realização de todos os testes experimentais propostos nesta pesquisa, foram colhidas 10 amostras de tumores de mama em cadelas. Os tumores foram classificados de acordo com o sistema TNM preconizado pela Organização Mundial de Saúde, onde T significa o diâmetro máximo do tumor, N o envolvimento de linfonodos regionais e M evidência de metástases à distância (OWEN, 1980; BRODY et al., 1983; ELLIS et al., 1991; SORENMO et al., 2011; CASSALI et al., 2011). Finalizada a coleta, as amostras, sob-refrigeração, foram transportadas para o Laboratório de Virologia Veterinária em tubos assépticos cônicos (Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lopes, NJ, USA) e, imediatamente, preparados para o cultivo “in vitro”. Ainda, outros fragmentos das mesmas amostras foram fixados em solução de formaldeído a 10% por 48 horas e processados de acordo com a técnica de inclusão em parafina, para o diagnóstico anatomopatológico do tumor, empregando-se o exame histopatológico, segundo a Organização Mundial de Saúde - Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas.

4.2. Preparo das amostras para o cultivo em monocamada aderente

Após a coleta das amostras em ambiente asséptico, os fragmentos foram preparados para o cultivo “in vitro”, adicionando-os em 50 µl de colagenase (10 mg/ml) e 10 ml de meio para cultivo RPMI 1640 (Gibco®-BRL, Gaithersburg, EUA) enriquecidos com 10.000UI penicilina, 10 mg estreptomicina e 25 µg

anfotericina B (Sigma-Aldrich® - St. Louis, MO, USA) e 10% soro fetal bovino (Gibco®-BRL– Canada, USA) sendo mantidos em tubos cônicos de 10 ml (Falcon, BD). Após 2 á 3 horas, em banho maria a 36° C, os fragmentos foram centrifugadas $2,465 \times g^6/5\text{min}$ (Centrifuge 5810 R, Eppendorf), e separado o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de tripsina 0,25% (Sigma-Aldrich® - St. Louis, MO, USA) e após 5 min foram novamente centrifugados, e o sobrenadante foi removido e trocado por novo meio de cultivo, adicionando os fragmentos em garrafas de polietileno para cultura de células de 25 cm², durante três dias consecutivos (Falcon, BD®, NJ, USA).

4.3. Diferenciação em células epiteliais

Após três dias de cultivo sob as condições descritas acima, realizou-se a troca do meio RPMI 1640 pelo meio *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM -Gibco®-BRL– Canada, USA), suplementado com as mesmas concentrações de penicilina, estreptomicina e anfotericina (Sigma-Aldrich®), 10 % soro fetal bovino (SFB) e 2 mg/ml de L-glutamina (Gibco®) (GALDERISI et al., 2008). Os cultivos foram avaliados, diariamente, por microscopia invertida até a formação de tapete único e contínuo (confluência), sendo o meio trocado a cada dois dias. A incubação foi mantida com uma atmosfera de 5% de CO₂ à temperatura de 38,5 °C (ABBOTT et al., 2009). No momento em que se observou a confluência celular, iniciou-se o processo de tripsinização com 0,25% de tripsina, na proporção de 1:2 e a passagem para novas garrafas (PATEL et al., 2011). Ao final da quarta passagem, os cultivos foram transferidos para o meio HuMEC (Gibco®-BRL– Canada, USA) para diferenciação das células mesenquimais para epiteliais, sendo adicionado extrato de hipófise bovina. Após a diferenciação, todas as células que apresentavam características morfológicas epiteliais foram divididas por linhagens em dois grupos distintos: o grupo de baixa passagem (BP), onde foram mantidas no cultivo de 10^o até a 20^o passagem, e o grupo de alta passagem (AP), correspondente às células que continuaram no cultivo de 30 até 58 passagens.

Ambos os grupos foram submetidos à imunofluorescência para p53 e incluídos no cultivo 3D para testes imunocitoquímicos (IC) e moleculares.

4.4. Imunofluorescência Indireta para avaliação do marcador p53

Para a imunofluorescência indireta (IF), as células foram cultivadas em lâminas específicas - "Culture Slides Chamber" (Falcon™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA), contendo 8 poços. Após a confluência das células, em cada poço foi adicionado 1 ml de solução fixadora (3: ácido acético e 2: metanol). A diluição do anticorpo monoclonal (anti-p53) (Tabela 1) foi realizada em solução PBS + Tween 0,1 % incubados "overnight", à temperatura 4°C. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário acoplado ao marcador FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) na diluição 1:100, por 30 min à temperatura ambiente e contra-coloração com DAPI. As imagens foram obtidas pelo microscópio fluorescência 280 nm AxioCam MRc (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) e processadas com sistema de análise de imagem pelo software AxioVision 4.8.3 (Carl Zeiss®). Os anticorpos e suas diluições podem ser visualizados na tabela 1.

4.5. Cultivo tridimensional (3D) e formação de esferoides

Foram adicionadas ao cultivo 3D as células do cultivo em monocamada de BP e AP. Sendo que as células de BP e AP foram incluídas em duplicata para os ensaios imunocitoquímico e quimioterápico. O cultivo 3D foi realizado com o kit AlgiMatrix™ 3D Cell Culture System (Gibco-BRL– Canada, USA) com seis poços (PATEL et al., 2011). O protocolo iniciou-se com a adição de 3,2 ml da suspensão das células contendo 0,4 ml do tampão de endurecimento AlgiMatrix® em cada poço, e um poço foi separado como controle negativo, contendo somente o meio de cultivo e SFB. O meio foi trocado diariamente e conduzido o acompanhamento para a formação de esferoides até o 28º dia. A documentação fotográfica foi realizada com a câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) aos 4º, 9º e 14º dias após a semeadura das

células, empregando-se o microscópio invertido Olympus IX 70 (Tokyo, Japan). O esquema demonstrativo encontra-se na FIGURA 2.

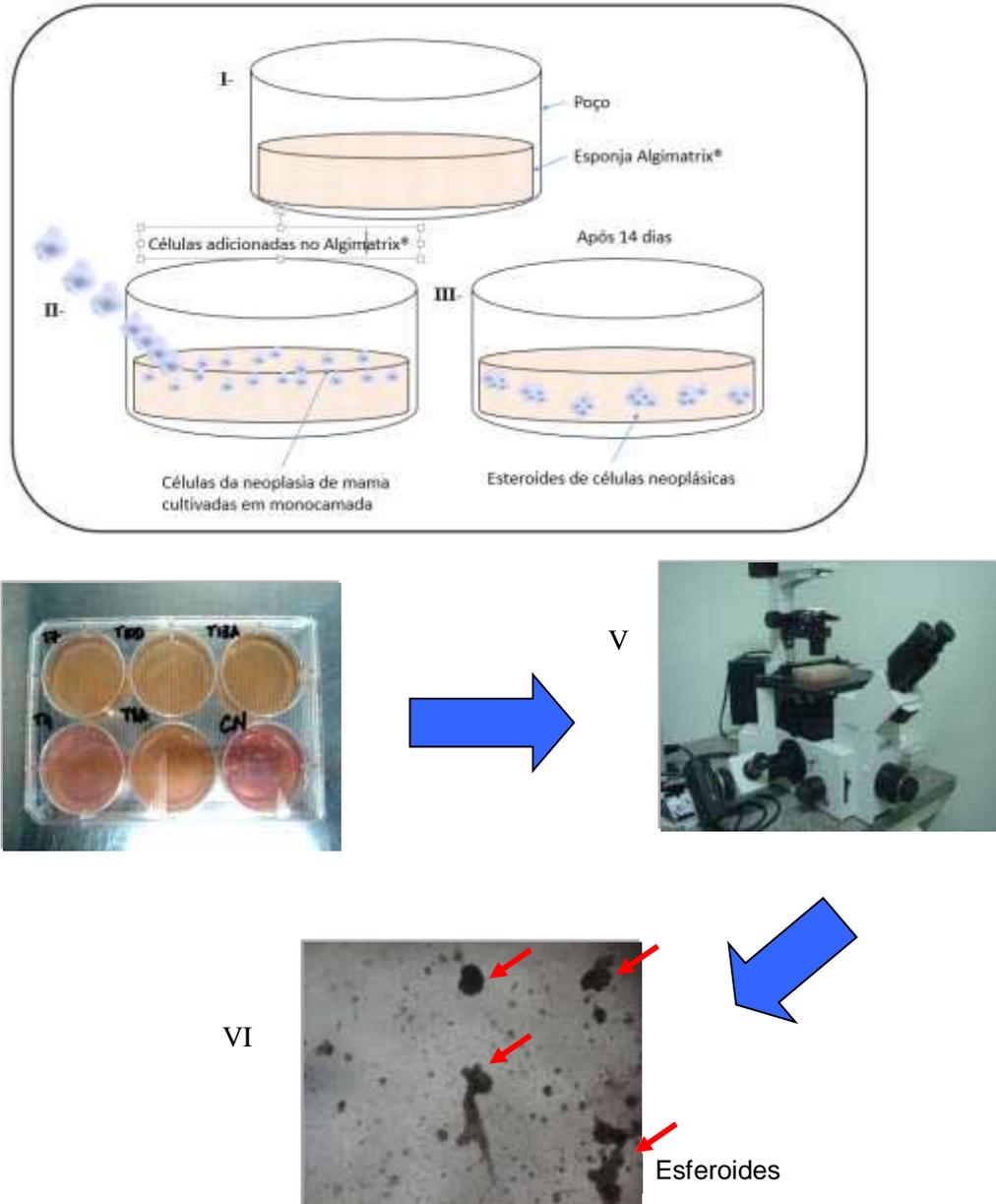


FIGURA 2 - Ilustração da metodologia do cultivo 3D: I- esquema dos poços do cultivo 3D com o Algimatrix™; II- Adição das células no cultivo (BP e AP); III- formação dos esferoides; IV- placa com 6 poços do kit Algimatrix™, onde as células do cultivo em monocamada foram adicionadas para a formação dos esferoides; V- Microscópio de Luz invertida utilizado para a visualização dos esferoides (Olympus IX 70); VI- Esferoides formados (20x)

4.6. Ensaios quimioterápicos no cultivo 3D

O tratamento com carboplatina foi realizado com a finalidade de avaliar, primeiramente, a viabilidade celular em cultivo 3D, a fim de se estabelecer um modelo “in vitro” para testes empregando fármacos quimioterápicos. Ainda, avaliar a expressão de marcadores de apoptose das células neoplásicas mamárias antes e após o tratamento. Adicionalmente, foi realizada a avaliação da citotoxicidade da carboplatina nos diferentes tipos histológicos, avaliando-se o tamanho e o número de esferoides, na presença do quimioterápico.

Ao término dos 28 dias de cultivo 3D, o grupo das amostras de BP, em duplicata, foi submetido ao tratamento quimioterápico com a carboplatina na concentração de 10mg/ml (27 μ M) (Vancel[®], laboratórios Pierre Fabre do Brasil, RJ). A dose utilizada foi previamente estabelecida em testes pilotos para DL50 com a técnica azul de Tripán 0,4% (1,25 μ M¹) (RIZVI et al, 2010). Como nas placas de cultivo 3D AP separadas para o ensaio quimioterápico não haviam esferoides presentes, não foi realizado o teste com carboplatina nas amostras de AP. Os esferoides formados no cultivo em 3D de BP, depois de transcorridos 28 dias, foram fotografados em campos iguais, por três dias (24h, 48h e 72h) completando, assim, 31 dias de cultivo sem tratamento. Após as imagens serem documentadas, foi adicionado o quimioterápico nos 6 poços e, novamente, realizado o registro fotográfico com três dias para posterior análise. Neste momento, avaliou-se o efeito citotóxico do quimioterápico no cultivo 3D, com a mensuração da área dos esferoides, antes e após o tratamento.

As fotografias, após 24, 48 e 72h, com e sem o quimioterápico, foram realizadas por documentação fotográfica com Microscopia invertida (Olympus IX 70) e, a mensuração da área dos esferoides foi realizada com o software AxioVision 4.8.3 (Carl Zeiss[®]) para posterior comparação entre os grupos.

Ao final, todas as amostras do cultivo 3D foram processadas e coradas com H.E com a finalidade de confirmar a presença de células neoplásicas para a realização dos testes imunocitoquímicos. (Figura 3). (KRAUSE et al., 2012).



FIGURA 3 - Ilustração da inclusão do gel do cultivo 3D no álcool 70% para o processamento histopatológico.

4.7. Imunocitoquímica para p53

O protocolo de imunocitoquímica (IC) foi realizado nos grupos de BP sem e com tratamento quimioterápico e nas amostras de AP sem tratamento. Cada grupo continha cinco amostras. A IC foi conduzida conforme o método estreptoavidina-biotina-peroxidase. Como controle, foi feita a adição de PBS (Solução Tamponada de Fosfato) em substituição do anticorpo primário para cada marcador específico. Após lavagens com PBS os cortes histológicos foram incubados com o anticorpo secundário biotilado (kit LSAB - DakoCytomation®, Carpinteria, CA), e posteriormente lavados com solução tampão e a incubação com o anticorpo secundário Kit Dako®. A coloração foi realizada empregando-se o kit Liquid DAB (diaminobenzidina) + Substrato (DakoCytomation®, Carpinteria, CA) e contra-corados com hematoxilina aquosa de Harris. As lâminas foram finalizadas com o meio Fluoromount™ (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO). Os anticorpos utilizados e suas diluições podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpo utilizado na imunocitoquímica e imunofluorescência, clone, fabricante e diluição.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
Anti-p53	SAB4503000	Sigma-Aldrich®	1:100

A avaliação microscópica para imunocitoquímica para a proteína p53 foi realizada com o microscópio Zeiss®, Axion Image A.1 - objetiva de 40x e 100x, com câmera integrada. Fotomicrografias foram digitalizadas com o software Zeiss®, AxioVision 4.7.

Para avaliar a imunomarcação de p53, nos dois métodos, foram utilizadas as seguintes classifica es: 0 (ausente); 1+ (discreto); 2+ (moderado) e 3+ (intenso) para a intensidade de marca o, e 0 (ausente); 1+ (<10% de marca o celular); 2+ (10 a 30%) e 3+ (30 a 70%) e 4+ (>70%) para a frequência de expressão (OLIVEIRA et al., 2006).

4.8. Análise Molecular para Expressão dos genes Bcl2, Bax, caspases 2, 3, 8 e 9.

Com a finalidade de observar o comportamento celular sem e com o tratamento quimioterápico no cultivo 3D, foi feita a análise molecular de quantifica o relativa, através da rea o em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para realizar esta etapa do experimento, parte das amostras do cultivo em 3D foi separada e congelada em *freezer* a -80 C, até o momento de ser processada.

4.8.1. Extra o do ácido ribonucleico (RNA)

O uso do PCR em tempo real para medir níveis de expressão de RNA mensageiros específicos requer o isolamento de RNA e conversão do mesmo em cDNA pela enzima transcriptase reversa. A extra o de RNA foi realizada com o reagente Trizol LS (Invitrogen), conforme instru es do fabricante. Para cada 250 L de células cultivadas em 3D, foram adicionados 750 L de Trizol LS Reagent e homogeneizadas por 15 segundos em v rtex. Em seguida, foram acrescentados 200 L de clorofórmio ultra puro 100% (livre de DNases e

RNases), realizando-se agitação por inversão. Após 7 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4°C e 500µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, com capacidade para 1,5mL. As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol “*overnight*”. No dia seguinte, após incubação por 10 min em temperatura ambiente, foi realizada a centrifugação por 10 min a 12,000xg a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras lavadas em 1 mL de etanol 70%. Os precipitados foram ressuspensos em 50µL de água ultra pura tratada com DEPC. O RNA extraído foi armazenado a -80 °C até o momento de sua utilização na reação de PCR em tempo real.

Para a execução do PCR, a síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído das amostras de tumor de mama cultivadas em 3D usando-se kit Enhanced Avian RT First Atrand Synthesis (Sigma-Aldrich®). Foram utilizados 8µL de cDNA, ao qual foi acrescentado 17µL da mistura dos reagentes presentes no kit. Para quantificação dos genes, foi utilizado o sistema TaqMan Gene Expression Assay® (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, USA). Este protocolo utilizou dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla era formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção por um supressor da fluorescência emitida que pode ser, então, medida pelo termociclador. Os genes alvo avaliados foram Bcl-2, Bax, caspase 2, 3, 8 e 9 e gene endógeno β-Actina. Suas especificações estão citadas na Tabela 2. As amplificações foram realizadas em microplacas especiais, de 96 orifícios com volume de 0,2 mL em cada um, e seladas com adesivos específicos para a leitura ótica do sistema de detecção e mensuração fotométrica do termociclador de PCR em tempo real (modelo StepOne Plus® - Applied Biosystems Inc., USA). A transcrição reversa transcorreu em um ciclo inicial de 30 minutos a 50°C e outro de 95°C por 15 minutos. Ato contínuo, iniciou-se a reação de PCR, que foi constituída por 45

ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 15 segundos e uma etapa de anelamento/extensão com 32 segundos a 60°C.

4.8.2. Avaliação da expressão gênica dos genes alvos

Os transcritos validados também foram escolhidos de forma a representar as principais diferenças nos processos celulares durante a apoptose sem e com tratamento quimioterápico. Os níveis relativos de expressão dos genes avaliados pelo PCR em tempo real pela técnica de quantificação relativa, foram determinados segundo o método Ct comparativo ou $\Delta\Delta\text{Ct}$. Nesse método, para cada amostra realizada foi obtido o valor Ct (ciclo limiar) que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra acima da linha de base e atinge o seu limite. Uma vez que a expressão do gene é analisada em relação ao controle interno, foi então calculado o ΔCt , ou seja, a diferença entre as médias do Ct de cada amostra e a média do Ct do controle interno (β -actina). Posteriormente, foi calculado o $\Delta\Delta\text{Ct}$ que consiste na diferença do ΔCt de cada amostra em relação ao ΔCt da amostra referência. Para calcular a razão relativa dos transcritos de cada gene em relação aos de transcritos na amostra de referência foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, que parte do princípio de que a cada ciclo da PCR, a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (LIVAK et al, 2001).

Tabela 2 - Genes de codificação para as proteínas envolvidas na regulação da apoptose e as seus correspondentes conjuntos de sondas.

Gene Alvo	Símbolo	Gene expression Assay	Sequencia (50 –30)
Bcl-2	BCL2	Cf02741602_m1	Forward: TGG ATG ACT GAG TAC CTG AA Reverse: GGC CTA CTG ACT TCA CTT AT
Bax	BAX	Cf02622185_g1	Forward: GGT TGT TGC CCT CCT CTA CT Reverse: GTA AGC ACT CCA GCC ACA AA
Caspase 2	CASP2	Cf02707196_m1	Forward: CTC TCA ATT GGC CAC CAT GGC Reverse: GGC CTC GAG TGT GGG AGG GTG
Caspase 3	CASP3	Cf02622231-m1	Forward : TTC ATT ATT CAG GCC TGC CGA GG Reverse: TTC TGA CAG GCC ATG TCA TCC TCA
Caspase 8	CASP8	Cf02707196_m1	Forward: TTC TGA CAG GCC ATG TCA TCC TCA Reverse: CCA GTG AAG TAA GAG GTC AGC TCA
Caspase 9	CASP9	Cf02627332_m1	Forward:TCA GTG ACG TCT GTG TTC AGG AGA Reverse:TTG TTG ATG ATG AGG CAG TAG CCG
β -actina	ACTB	Cf03034055_u1	Forward:GGC ACC CAG CAC AAT GAA Reverse :GCC GAT CCA CAC GGA GTA

(DEL PUERTO et al, 2010; NAGAMATSU, 2008)

4.9. Análise Estatística

Com a finalidade de analisar a imunomarcagem para o cultivo em monocamada pela técnica de IF para a p53, foi realizada a comparação entre os grupos de BP e AP, utilizando o teste de Mann-Whitney.

As técnicas de IF (cultivo monocamada) e IC (cultivo 3D) nas amostras de AP, para a p53 foram comparadas com o teste não paramétrico de Wilcoxon. O mesmo teste também foi utilizado para avaliar a eficiência da carboplatina em amostras de BP.

Os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ foram normalizados com \log_{10} e aplicado o teste t pareado para a comparação da expressão dos genes alvo antes e após o tratamento com carboplatina.

O programa estatístico utilizado foi InStat GraphPad Prism versão 6.

V. RESULTADOS

5.1. Estadiamento clínico e análise histopatológica

As 10 amostras de tumores mamários de cadelas foram selecionadas para serem adicionadas ao cultivo em monocamada e, posteriormente, introduzidas no cultivo 3D. Todas apresentaram uma boa confluência até a quarta passagem e bem como diferenciação epitelial até a 58^a passagem. Após a análise histopatológica dessas amostras foram observadas as seguintes classificações: carcinoma papilar; carcinoma anaplásico; carcinoma de células escamosas; carcinossarcoma; tumor misto benigno; adenoma complexo; carcinoma sólido (2 amostras) e 8) carcinoma complexo (2 amostras). Ao classificarmos de acordo com o Sistema TNM-modificado (OWEN, 1980) foi observado que quatro, entre 10 pacientes, apresentavam-se nos estádios II e III; e duas entre as 10 cadelas, encontravam-se no estádio I; e três apresentavam evidências de metástase pulmonar, ao exame radiográfico. As características clinico-patológicas de cada amostra, bem como, os tipos histológicos diagnosticados, podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Apresentação das amostras de tumores mamários, de acordo com a raça, idade, estadiamento clínico, tipo histológico e grau histológico (OWEN, 1980).

Amostras	Raça	Idade	Tamanho da lesão primária (T)	Linfonodos regionais(N)	Metástases(M)	Estádio Clínico	Tipo histológico	Grau histológico
1	Boxer	9	T3	N0	M1	III	Carcinoma Anaplásico	III
2	SRD	11	T2	N0	M0	III	Carcinoma Papilar	I
3	Poodle	10	T1	N0	M0	I	Carcinoma Complexo	II
4	SRD	12	T1	N0	M0	II	Carcinoma Sólido	III
5	SRD	10	T1	N0	M1	II	Carcinoma Complexo	I
6	Teckel	12	T3	N0	M0	III	Carcinoma Sólido	III
7	SRD	12	T2	N0	M0	II	Carcinoma de Células Escamosas	III
8	Pastor Alemão	11	T3	N0	M0	III	Carcinossarcoma	II
9	Pincher	10	T1	N0	M1	I	Tumor Misto Benigno	I
10	SRD	10	T2	N0	M0	II	Adenoma Complexo	III

Legenda:

Tamanho do tumor: T1 = Tumor < 3cm de diâmetro. T2 = Tumor entre 3-5cm de diâmetro. T3 = Tumor > 5cm de diâmetro.

Linfonodo: N0 = Sem evidência de metástase em linfonodo regional. N1= presença de metástase em linfonodo regional

Metástase: M0 = Sem evidência de metástases à distância.M1= evidência de metástase à distancia

Grau histológico = Utilizado o método semi-quantitativo para avaliação do grau histológico em carcinomas mamários, proposto por Elston & Ellis (1991).

5.2. Cultivo das células dos tumores de mama em monocamada de BP até AP

Algumas amostras do cultivo em monocamada, ao serem tripsinizadas, não aderiram ao substrato ou, quando aderiram, não alcançaram um crescimento satisfatório, com morte celular em poucos dias. Por esse motivo, esses cultivos foram excluídos do experimento e um novo cultivo foi iniciado, até que se completasse o total de 10 amostras, conforme proposto nesta pesquisa. Os cultivos que apresentaram um bom crescimento até a quarta passagem, foram transferidos para outro meio específico para células epiteliais, como citado anteriormente no item 4.3. Com a observação diária, foi possível acompanhar a diferenciação celular até a formação de um tapete único de células epiteliais (FIGURA 4-B). Após atingirem a diferenciação, os cultivos apresentaram um crescimento rápido e contínuo até aproximadamente a 58^a. passagem. Neste momento, as células iniciaram o processo de morte celular, observando-se o desprendimento do tapete celular.

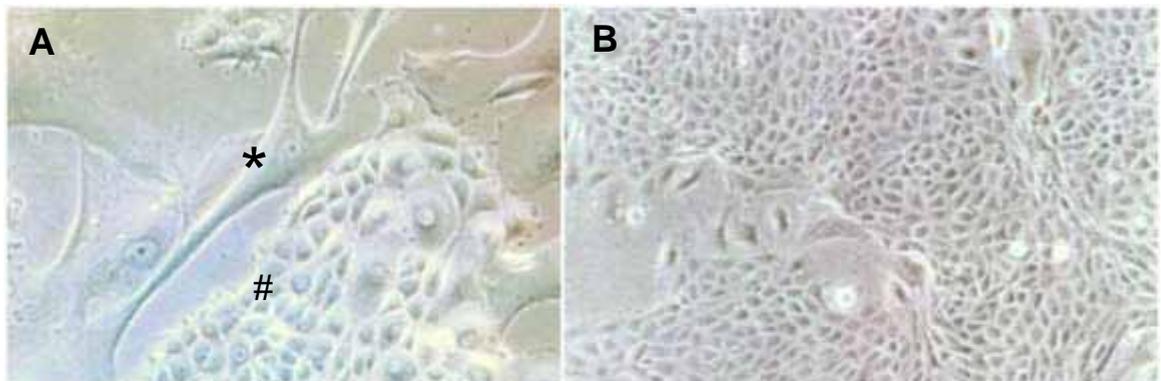


FIGURA 4 - Fotomicrografia do cultivo em monocamada de células de neoplasia de mama em cadelas. (A) Em maior aumento, observam-se células com morfologia mesenquimal (*) e células com crescimento epitelial (#) (Obj.100x). (B) Formação de tapete único de células epiteliais (Obj. 40x)

5.3. Imunofluorescência indireta (IF) para a p53 no cultivo em monocamada em BP e AP

A técnica de IF foi aplicada no cultivo em monocamada de BP e AP e teve por finalidade avaliar a imunomarcagem da proteína p53 no momento da fase

proliferativa e no início do processo de apoptose celular. Foram consideradas como amostras positivas àquelas cujas células apresentavam pontos de coloração verde fluorescente no citoplasma, marcados pelo cromógeno FITC, e contrastadas com o azul do núcleo celular. Todos os cultivos analisados foram marcados pelo anticorpo, denotando a imunomarcação da p53. Ressalta-se que os tumores adenoma complexo, tumor misto benigno, carcinosarcoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma sólido (n=2) permaneceram sob as condições de cultivo apenas até a 20^a. passagem (BP) e que, as demais neoplasias sobreviveram temporalmente até a 58^a passagem (AP). FIGURA 5.

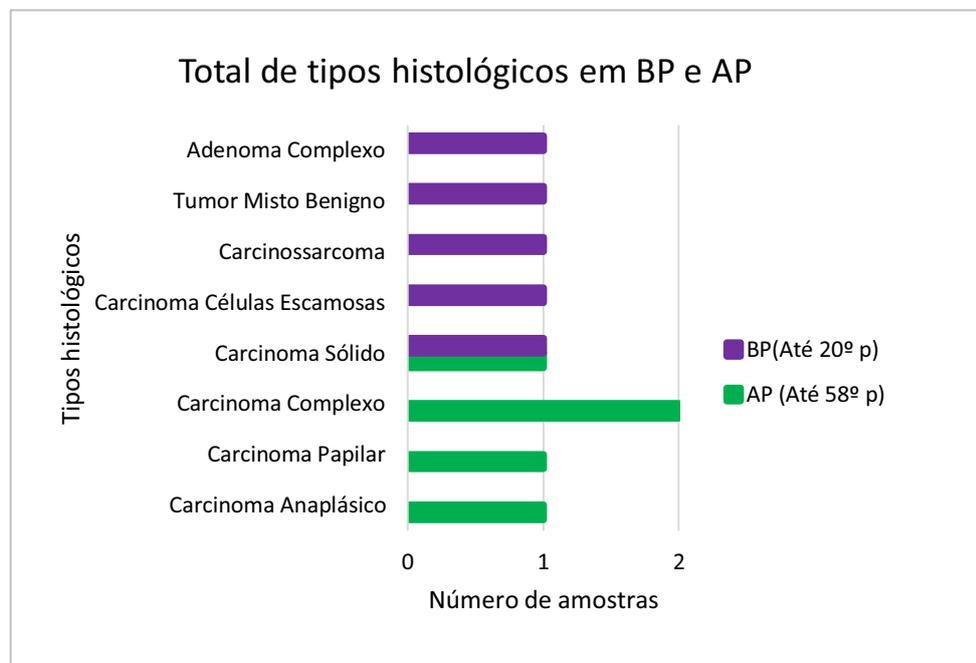


FIGURA 5 – Número de amostras de acordo com o tipo histológico e respectivo grupo de cultivo.

Ao serem comparados os cultivos de AP e BP com a técnica de IF, verificou-se que, em relação à frequência, a p53 manteve expressão similar entre os cultivos, sem diferença significativa. Também foi possível observar imunomarcação, em variados graus de intensidade, em 100% dos tumores. Na Tabela 4 é possível visualizar a expressão média deste agente pró-apoptótico nos cultivos de BP e AP.

Tabela 4 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da frequência (em porcentagem), segundo a Imunofluorescência para p53 no cultivo de monocamada em BP e AP.

Marcador	Baixa passagem		Alta passagem		p ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	
p53	15,2±6,9	10,5	29,8±29,0	25,0	0,7143

¹ teste de Mann-Whitney

A intensidade de marcação, mensurada em escores, também não apresentou diferença significativa. Para os tumores em BP, observou-se 100% de intensidade de escore 2; e nos cultivos de AP, apenas o carcinoma papilar apresentou maior intensidade de imunomarcação. Na Tabela 5 é possível observar os valores medianos, mínimo e máximo, do marcador de acordo com BP e AP. A FIGURA 6 mostra a imunomarcação segundo a frequência e escore pelo método de imunofluorescência. Os tumores carcinomas anaplásico e sólido (na AP) e carcinomas complexo e de células escamosas (na BP) apresentaram imunomarcações nuclear e citoplasmática. Os demais incluídos no estudo apresentaram apenas marcação citoplasmática.

Tabela 5 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) com relação à *intensidade* imunomarcação para p53 no cultivo em monocamada em BP e AP.

Marcador	Baixa passagem		Alta passagem		p ⁽¹⁾
	Md	Min – Max	Md	Min – Max	
p53	2	2 -2	2	1 - 4	0,6605

¹ teste de Mann-Whitney

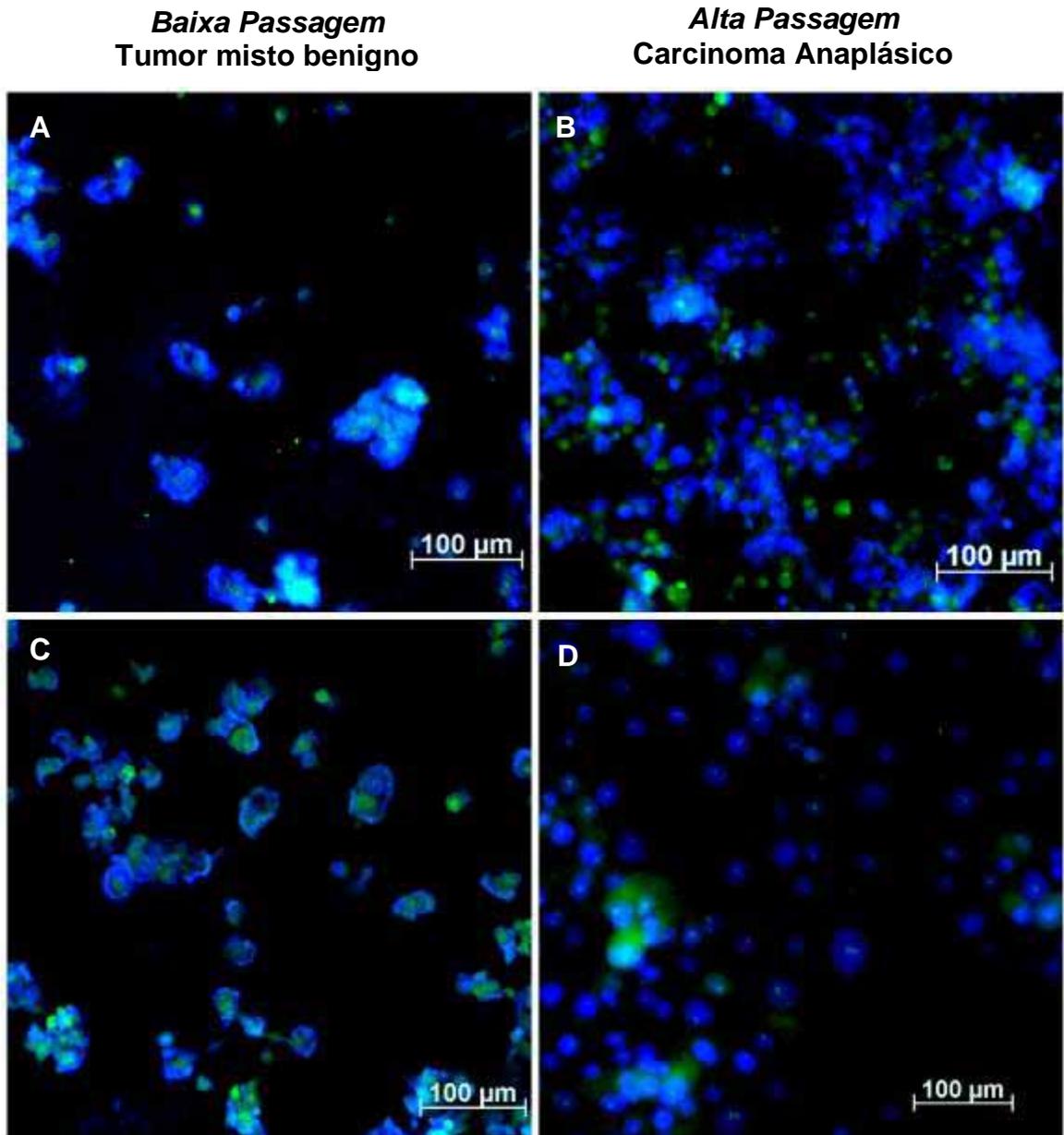


FIGURA 6 - Fotomicrografias da IF dos cultivos em monocamada mostrando a marcação da p53 nos carcinomas misto benigno e anaplásico em BP e AP respectivamente. Notar que as células possuem os núcleos com a cor azul e marcação positiva, representada pelo cromógeno verde fluorescente (A, C e D Obj.100X; B Obj. 40X) (Cromógeno - FITC).

5.4. Histopatológico do cultivo 3D – BP e AP

As amostras cultivadas em 3D de BP foram tratadas com carboplatina, porém as de AP não receberam o tratamento, pois foi observado que as mesmas já haviam morrido após a transferência da monocamada para o cultivo 3D. Nos cultivos 3D, quando analisadas com relação à morfologia celular, foi observado que nos grupos BP e AP havia diferenças significativas com relação a integridade das células. No grupo de BP, observavam-se células íntegras com citoplasma bem delimitado, hipercromasia e nucléolos visíveis e, algumas vezes, múltiplos. Porém, no grupo de AP, foi possível observar agrupamentos de células íntegras com características neoplásicas (FIGURA 7). Salienta-se que estavam presentes os sinais de morte celular, representados por corpos apoptóticos e debris celulares.

As amostras referentes aos grupos BP controles e com carboplatina também, foram analisadas histologicamente. Esta avaliação revelou que, no grupo tratado por carboplatina havia restos celulares entre o gel de cultivo (matrigel) (FIGURA 8). Maiores detalhes sobre o efeito da carboplatina nos cultivos 3D do tumor de mama estão descritos no próximo item (5.5).

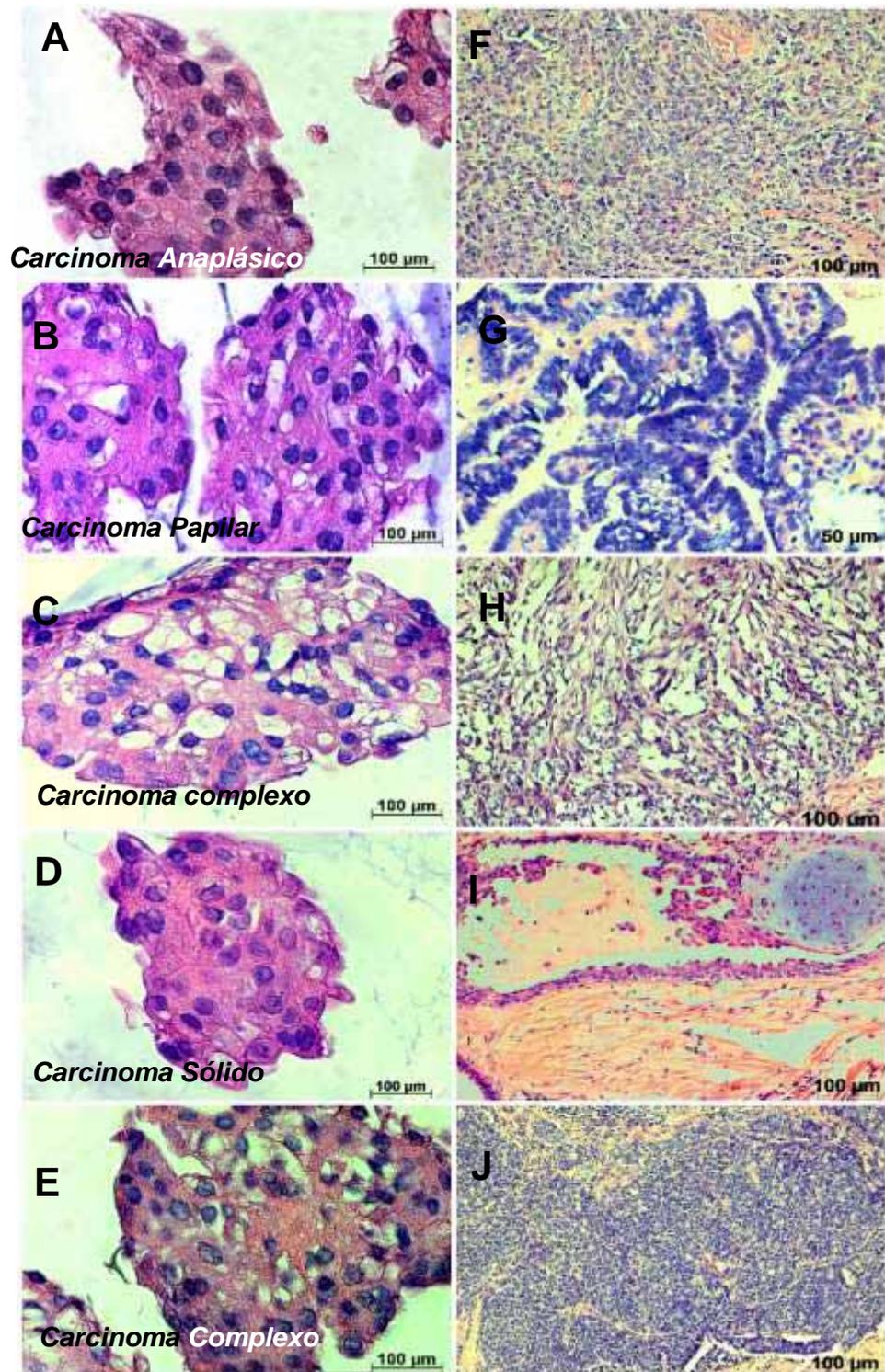


FIGURA 7 - Fotomicrografias dos cultivos celulares em AP, onde, em **A, B, C, D e E** podem ser observados grupos de células neoplásicas representando os esferoides formados durante o cultivo 3D (H.E. 100x). As fotomicrografias **F, G, H, I, J** correspondem aos cortes histológicos de cada amostra do grupo AP. (F,H,J H.E. 10x e G H.E. 40x).

5.5. Efeito da carboplatina no cultivo 3D de BP

Nas primeiras 24h, foi possível observar uma marcante diminuição do número de esferoides, porém, o inverso ocorreu no caso do carcinoma de células escamosas e do carcinosarcoma, em que os esferoides aumentaram em quantidade ao final de 24h. Houve redução em tamanho e número de esferoides em todas as amostras analisadas ao término de 72 horas. A mensuração da área e do número de esferoides pode ser observada nas FIGURAS 10 e 11, respectivamente. A eficiência em promover morte celular pode ser visualizada na Tabela 7. Detalhes sobre o cálculo do tamanho e número dos esferoides podem ser observados na FIGURA 9.

Ao realizar o cálculo da média e da soma do número de esferoides, antes e após o tratamento, verificou-se que média da área dos mesmos, diminuiu em 53,36%, no primeiro dia. A redução ao segundo dia foi de 59,68%, sendo expressiva no terceiro dia (28,45%). A análise estatística mostrou que a diferença entre os grupos sem (Grupo Controle) e com carboplatina (Grupo Tratado) foi significativa nos momentos 24 a 48 horas. No carcinoma de célula escamosa e carcinosarcoma, a diminuição foi significativa nas últimas 72 horas. Para o tumor misto benigno a diminuição foi significativa em todo o período ($p < 0,05$) (Tabela 6).

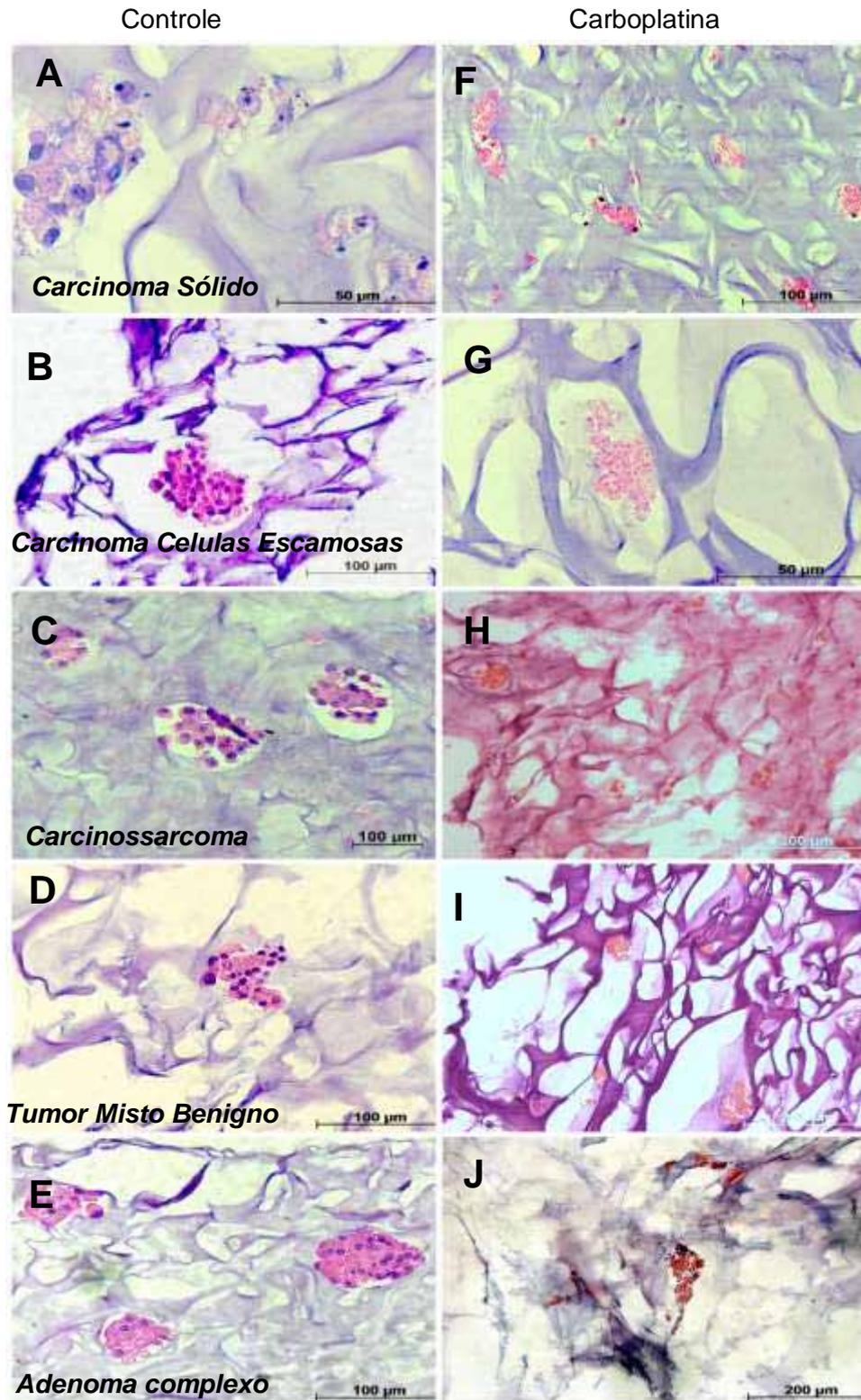


FIGURA 8 – Fotomicrografias dos cultivos em 3D – BP, **A, B, C, D e E**, correspondem as amostras controle e **F, G, H, I, J**, amostras com carboplatina.

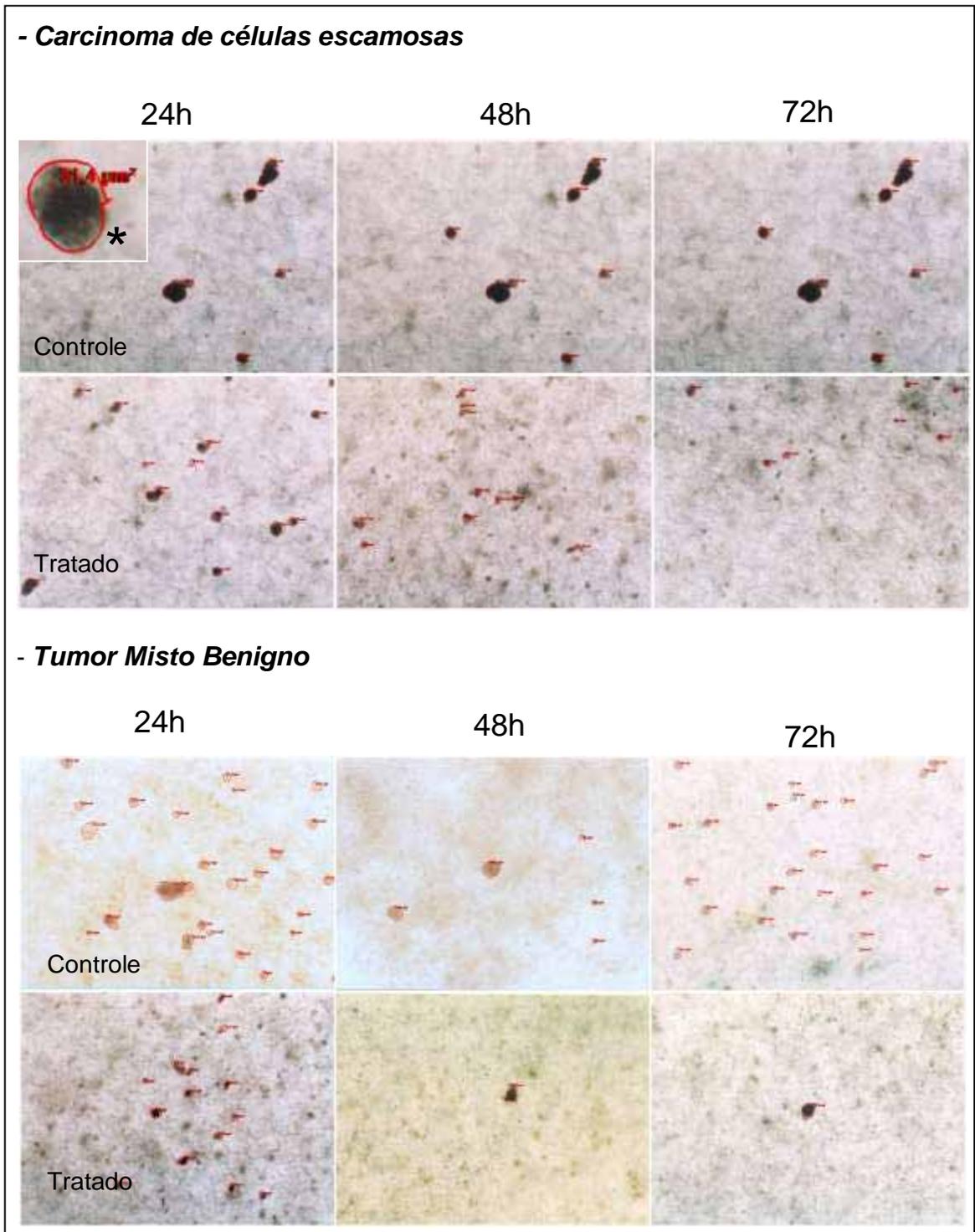


FIGURA 9 - Fotomicrografia da área dos esferoides provenientes do cultivo 3D que foram submetidos ao tratamento com carboplatina por 24, 48 e 72h e seus respectivos controles (Obj. 40x). (*)detalhe da medição da área dos esferoides. Os dados foram processados com o sistema de análise de imagem, software AxioVision 4.8.3 (Carl Zeiss®).

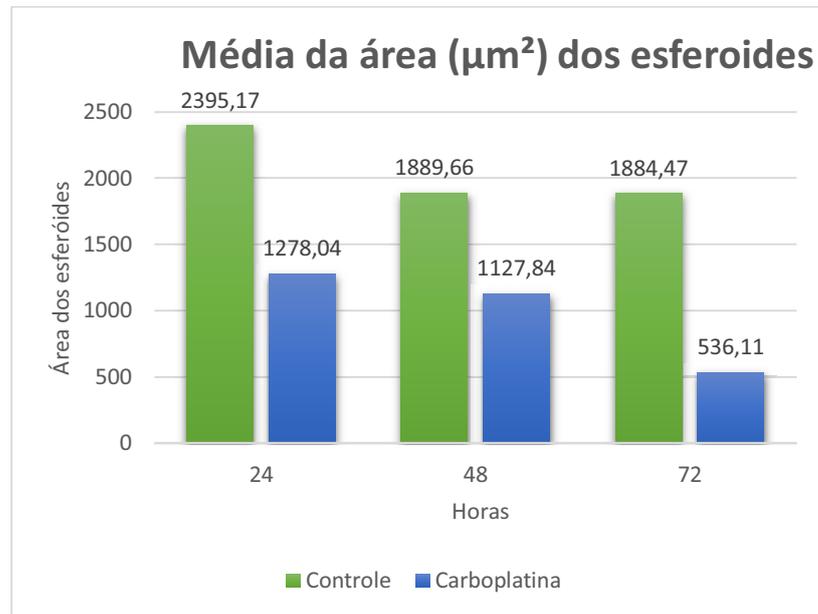


FIGURA 10 – Ação da carboplatina em relação à área dos esferóides no cultivo 3D durante 24, 48 e 72 horas de tratamento.

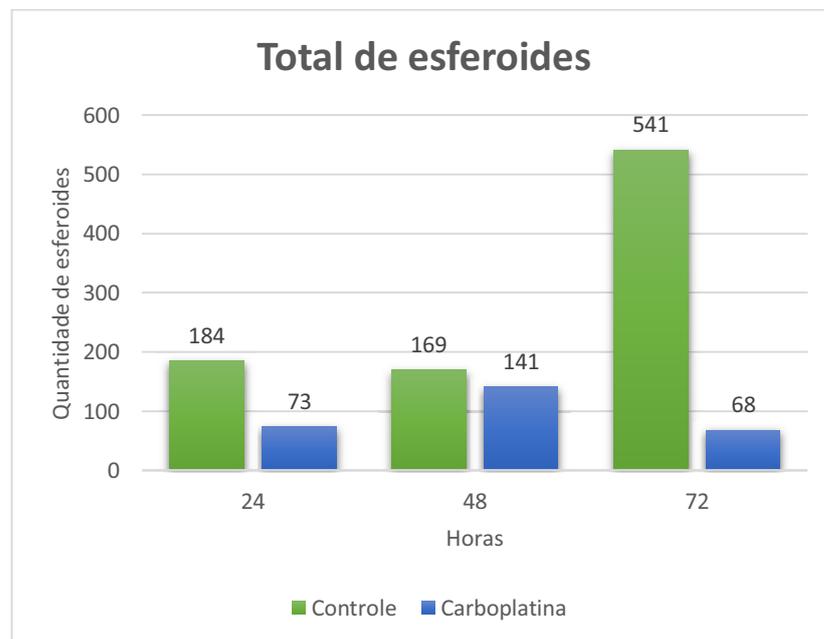


FIGURA 11 – Ação da carboplatina em relação à quantidade dos esferoides no cultivo 3D durante 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Tabela 6 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max), da área e numero de esferoides a partir das amostras sem (controle) e com carboplatina (tratado).

TIPO HISTOLÓGICO	TEMPO (h)	CONTROLE			CARBOPLATINA			p ¹
		Qde de esferóides	Md	Min - Max	Qde de esferóides	Md	Min - Max	
Carcinoma sólido	24	18	21,50	6,07-124,19	5	6,49	0,0-58,13	0,0001
	48	25	10,94	3,38-19,42	14	7,83	0,0-27,60	0,0634
	72	1	-	53,30	1	-	47,80	-
Carcinoma células escamosas	24	8	44,60	21,59-21,59	8	27,38	8,37-48,13	0,0078
	48	6	35,17	0,00-133,03	10	11,74	28,54-11,43	0,2750
	72	6	47,77	0,00-123,18	7	9,64	2,41-22,60	0,0313
Carcinossarcoma	24	9	23,74	11,50-55,95	6	13,8	0,00-35,48	0,0039
	48	13	21,00	4,71-67,850	9	8,44	0,00-22,65	0,0002
	72	10	49,49	8,78-96,24	3	4,37	0,00-16,42	0,0020
Tumor misto benigno	24	1	-	58,78	1	-	19,37	-
	48	2	18,55	12,29-24,82	1	12,57	0,00-25,1	0,9999
	72	9	15,94	3,31-42,40	6	2,94	0,00-7,21	0,0039
Adenoma complexo	24	67	14,05	1,52-101,58	10	2,33	0,00-55,77	0,0001
	48	30	11,33	3,29-31,70	21	5,36	0,00-18,20	0,0001
	72	7	8,04	0,00-53,21	21	7,06	2,60-13,41	0,5782

¹Teste de Wilcoxon

5.6. Avaliação da expressão da p53 para a imunocitoquímica (IC) nos cultivos 3D em BP e AP.

Nos cultivos de AP, observaram-se agrupamentos celulares em todas as amostras e, em 60% delas, em BP. Ao se comparar em grupos de BP e AP, não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) (Tabelas 7 e 8). A p53 apresentou imunomarcção nuclear e citoplasmática em 70% das amostras em ambos os grupos (BP e AP) e, somente no carcinoma papilar a marcação não foi observada. Não foram encontradas diferenças significantes ao se comparar em as técnicas de IF e IC quanto a marcação da p53 ($p < 0,05$) (Tabelas 9 e 10). Porém, ao analisar-se individualmente cada tipo histológico e comparando-os com seus respectivos graus histológicos e classificação, verificou-se que os tumores com grau III (carcinoma anaplásico, carcinoma sólido, carcinoma de células escamosas e adenoma complexo) apresentaram alta frequência e quantidade de imunomarcção para p53. O padrão de

imunomarcação para p53 na imunocitoquímica, pode ser observado na FIGURA 12.

Tabela 7 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da *frequência* em porcentagem, segundo a imunocitoquímica para p53 no cultivo 3D em BP e AP.

Marcador	Baixa passagem		Alta passagem		p ⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	
p53	32,4±34,9	5,0	68,0±32,0	80,0	0,1250

¹ teste de Mann-Whitney

Tabela 8 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade em escores, segundo a imunocitoquímica para p53 no cultivo 3D em BP e AP.

Marcador	Baixa passagem		Alta passagem		p ⁽¹⁾
	Md	Min - Max	Md	Min - Max	
p53	3	1 - 4	3	1 - 4	0,6105

¹ teste de Mann-Whitney

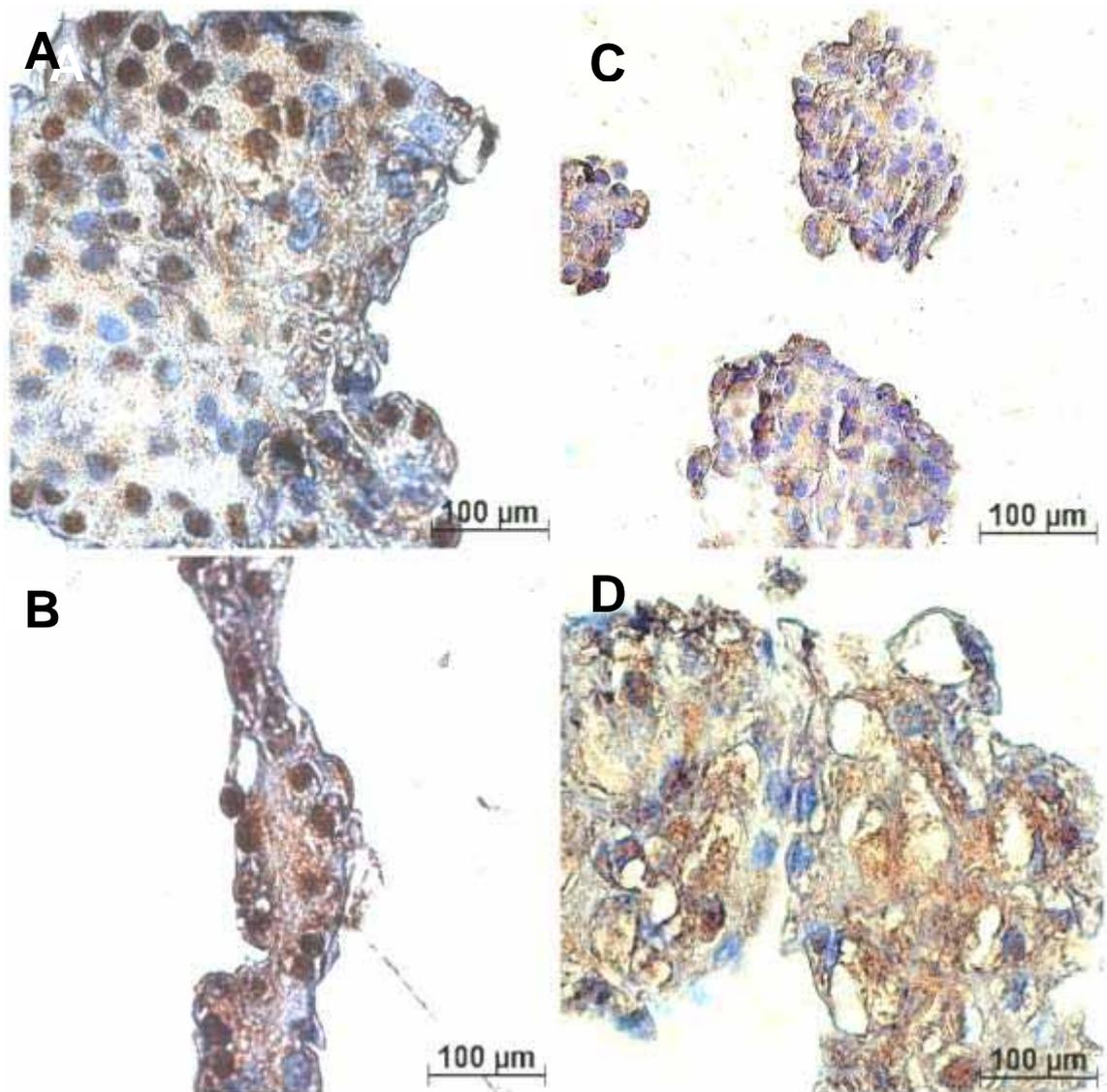


FIGURA 12 - Fotomicrografias da imunocitoquímica dos cultivos em 3D onde A e B são “BP” e C e D são “AP”. As células, quando positivas, apresentam citoplasma corado de marrom (Cromógeno - DAB) (obj. 100x).

Foi observado que a amostra de carcinoma papilar não apresentou marcação para a proteína em questão com a técnica de IC, mas no cultivo em monocamada na imunofluorescência, a marcação apresentou 85% de frequência e foi a amostra que apresentou maior intensidade.

Tabela 9 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e mediana (Md) da frequência em porcentagem, segundo o método utilizado para p53 no cultivo em monocamada e em 3D.

Marcador	Imunocitoquímica			Imunofluorescência			p ⁽¹⁾
	\bar{x}	$\pm S$	Md	\bar{x}	$\pm S$	Md	
p53	50,2	$\pm 38,0$	72,5	22,5	$\pm 22,3$	16,3	0,5896

¹ teste de Wilcoxon

Tabela 10 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade, em escores, segundo o método utilizado para p53 nos tumores mamários em AP e BP.

Marcador	Imunocitoquímica		Imunofluorescência		p ⁽¹⁾
	Md	Min – Max	Md	Min – Max	
p53	3	1 -4	2	1 -4	0,2188

¹ teste de Wilcoxon

5.7. Análise molecular para os marcadores da apoptose no cultivo 3D em BP

Todas as amostras de BP que receberam tratamento com carboplatina foram submetidas à reação de amplificação (antes e após o tratamento) pela técnica de PCR em tempo real, utilizando-se o método de quantificação relativa e de comparação com o valor de Ct de cada gene expresso. As sequências alvo para as amostras foram: caspases 2, 3, 8, 9, Bax e Bcl-2. A β -actina foi utilizada como sequência específica. Após a amplificação e detecção da fluorescência, foi realizado o cálculo do valor de Ct e aplicado a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foram consideradas amplificadas as amostras com valor de Ct abaixo de 29 para as triplicatas. Os resultados da amplificação de cada amostra com valores de Ct, a aplicação da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, assim como o valor transformado em Log_{10} , estão apresentados na FIGURA 13.

Foram consideradas positivas as ampliações dos seguintes genes alvo para as amostras tratadas com carboplatina: caspase 8, caspase 9, Bax e Bcl-2. Apenas duas amostras deste grupo (carcinoma complexo e carcinoma sólido) foram positivas para Bcl-2. Não ocorreu amplificação dos genes das caspases 2 e 3. Houve amplificação dos genes estudados em todas as amostras que não receberam tratamento (controle) com carboplatina, com exceção do gene Bax. O perfil da expressão de cada gene pode ser melhor visualizado na FIGURA 14. Ao comparar a expressão das amostras controle e tratadas, foi verificado que não houve diferença estatística apenas para o gene caspase 9 ($p < 0,05$). Para os demais genes estudados houve diferença significativa (Tabela 11).

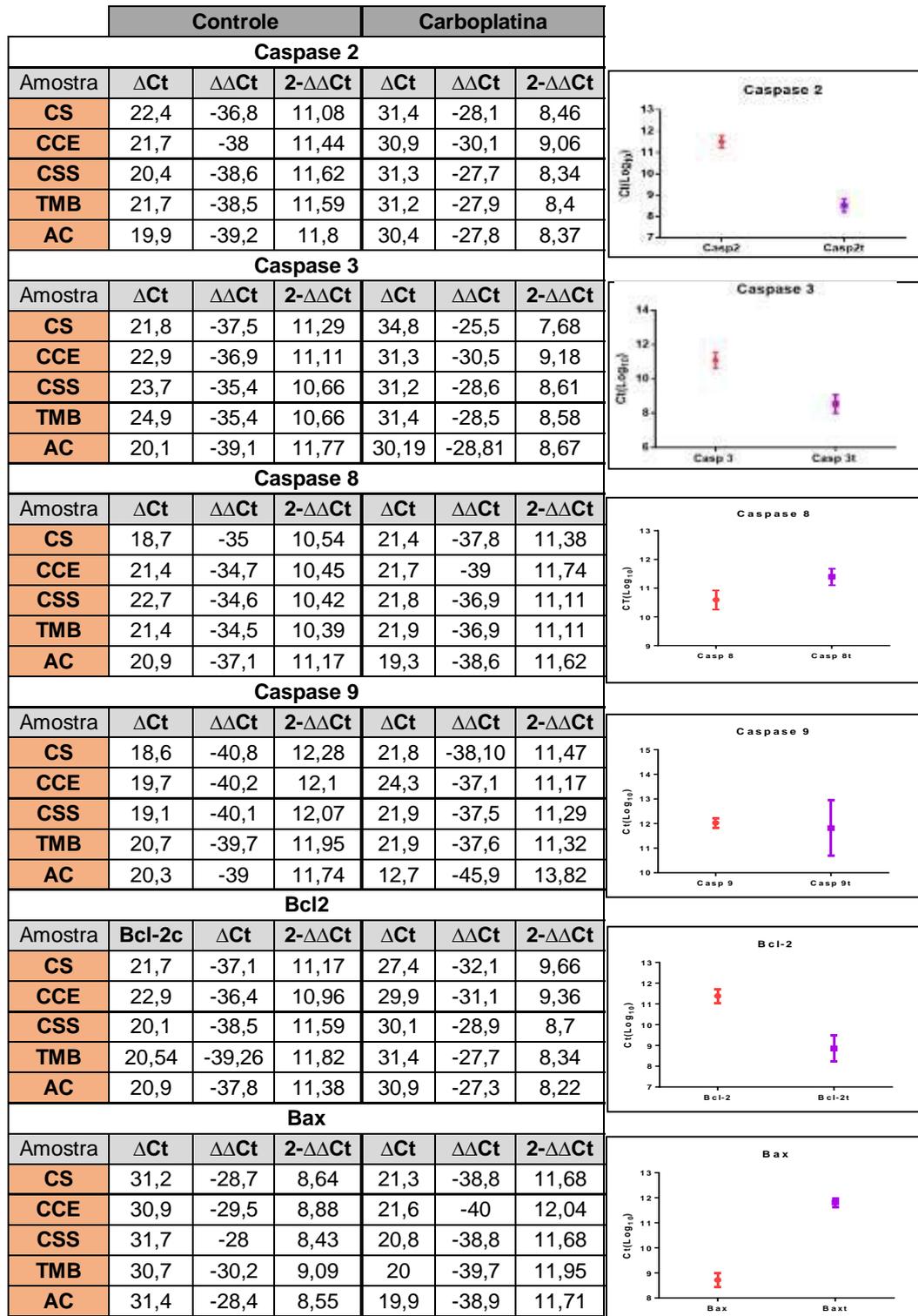


FIGURA 13 – Valores e perfil da expressão dos genes caspases 2, 3, 8, 9, Bcl-2 e Bax, nas amostras do cultivo 3D de neoplasias mamárias de cadelas submetidas ao tratamento com carboplatina e respectivos controles. (CS=carcinoma sólido; CCE=carcinoma de células escamosas; CSS=carcinossarcoma; TMB=tumor misto benigno; AC=adenoma complexo).

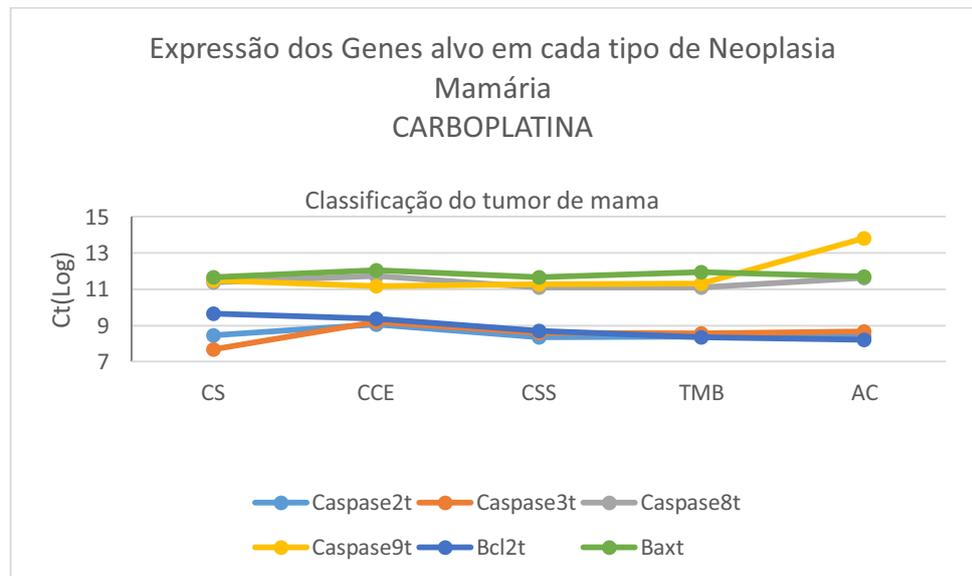
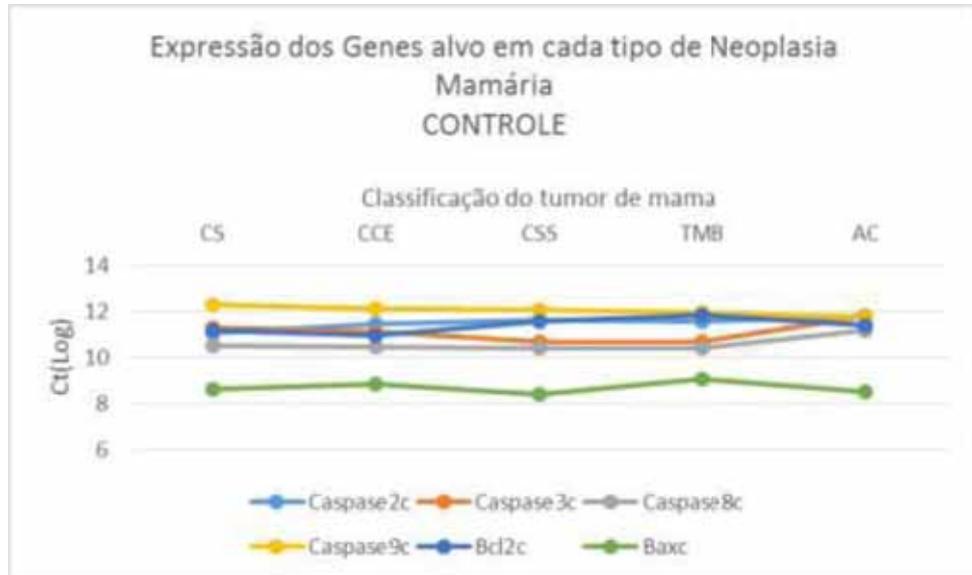


FIGURA 14 - Perfil da expressão de caspase 2, caspase 3, caspase 8, caspase 9, Bcl-2 e Bax, com relação ao tipo de neoplasia. (CS=carcinoma sólido; CCE=carcinoma de células escamosas; CSS=carcinossarcoma; TMB=tumor misto benigno; AC=adenoma complexo).

Tabela 11 - Valores de média (\bar{x}), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (cv) da expressão dos genes alvo em amostras de BP antes e após o tratamento com carboplatina.

Gene Alvo	Não tratado	Tratado	CV%	P ¹
	$\bar{x} \pm S$	$\bar{x} \pm S$		
Caspase 2	11,51±0,27	8,53±0,30	3,21	0.0001
Caspase 3	11,10±0,47	8,54±0,54	5,43	0,0016
Caspase 8	10,59±0,33	11,39±0,29	1,99	0.0045
Caspase 9	12,03±0,20	11,81±1,13	7,63	0,73
Bcl-2	11,38±0,34	8,86±0,63	6,38	0.0035
Bax	8,72±0,27	11,81±0,17	1,04	<0,0001

¹ Teste t - pareado

VI. DISCUSSÃO

Estadiamento clínico e análise histopatológica

Os tipos histológicos encontrados neste estudo, bem como suas graduações histológicas foram considerados diversificadas. As 10 amostras foram originadas de animais em três níveis de estadiamento clínico sendo que, três deles apresentavam metástases à distância, com valor prognóstico desfavorável. Essa diversidade, embora não intencional, permitiu relacionar a expressão dos genes estudados com a classificação histológica, estadiamento clínico ou grau histológico. Tais dados serão discutidos mais a frente neste texto de forma individualizada.

Cultivo em monocamada de BP até AP

As amostras tumorais incluídas neste estudo e submetidas ao cultivo inicial, em monocamada apresentaram comportamentos distintos. Quando colhidas, passaram pelo processo inicial de degradação mecânica, decorrente do corte dos fragmentos de tecido neoplásico que, em seguida, foram submetidas à digestão enzimática com a colagenase. As células que conseguiram sobreviver ao processo de degradação inicial aderiram à garrafa, formando a primeira monocamada de células de tumor mamário canino, em quatro dias. Essas células apresentavam a mesma característica do tecido tumoral de origem e, por esse motivo, cresceram sob condições de cultura celular por períodos indeterminados, pois acredita-se que as células neoplásicas apresentem mutações que possam levar tanto à apoptose, como a proliferação contínua e descontrolada (VREMEULEN, 2003). À medida que é realizado o processo de renovação celular de uma garrafa para outra, denominado de passagem, as células com maior capacidade de proliferação permaneceram viáveis no cultivo, formando a linhagem celular contínua. As mesmas puderam permanecer no cultivo por longos períodos (58 passagens). As que não se adaptaram ao meio, podem ter sofrido apoptose devido aos traumas iatrogênicos no processo de degradação, ou por não possuírem uma taxa fisiológica de

proliferação. Muitas linhagens celulares contínuas de tecido não tumoral podem ser propagadas sem perder suas características por até 80 passagens, porém, quando se trata de tecido neoplásico, não é possível prever a longevidade das células (FRESHNEY, 1994; VREMEULEN, 2003). No presente estudo, observaram-se amostras que permaneceram de 28 a 30 passagens (BP=baixa passagem), e outras que sobreviveram até 58 passagens (AP=alta passagem). Após esse período, observou-se que as células entravam em apoptose. Portanto, este momento foi o preconizado para conduzir os ensaios realizados. Xie et al. (2012) relataram que células em cultivos de AP apresentam alterações na morfologia celular, na resposta a estímulos, taxas de crescimento, expressão de proteínas, sinalização celular e carcinogênese distintas, quando comparadas com as células de BP. Neste estudo, não foram observados as referidas alterações, com exceção de que, nos cultivos de AP, as células eram mais abundantes, porém apresentavam aumento do volume celular sem alterações em seu fenótipo, comparativamente àquelas oriundas do cultivo de BP. No entanto, isto não foi impeditivo para condução dos ensaios aqui descritos. Porém, os mesmos autores informam que, para se obter em resultados confiáveis, é importante realizar os testes com linhagens celulares, com menor número de passagens, evitando-se o uso de células que permaneceram por tempos prolongados sob condições de cultura.

A troca do meio de cultivo para o meio específico para células epiteliais (HUMEC®) foi realizada com o objetivo de aumentar a viabilidade e crescimento de células do tumor de mama e, assim, permitir a obtenção de resultados fidedignos quanto à proposta original de utilização do cultivo 3D, do teste “in vitro” com a carboplatina e estudo da expressão gênica (POCZOBUTT et al., 2010).

Cultivo 3D

No cultivo 3D foi possível observar o crescimento das células neoplásicas oriundas do cultivo em monocamada, em uma matriz tridimensional organizada, ao longo do tempo aqui descrito. Observou-se, também, que o comportamento celular é dependente das interações com as células vizinhas e com o meio

extracelular, pois houve a formação de grumos celulares, que são denominados como esferoides (PATEL et al., 2011).

Foi possível comparar dois métodos de cultivo (monocamada e o cultivo em 3D) e verificou-se que é possível manipular e cultivar as células oriundas de tumor de mama em cadelas nesses microambientes, e assim, direcionar os ensaios para o estudo de interesse. Apesar de serem técnicas laboriosas, elas encurtam o tempo de obtenção de dados. Particularmente, o cultivo 3D apresentou como única desvantagem referente aos custos operacionais, o que, pode inviabilizar o uso deste método na rotina prática diagnóstica, quando houver restrição orçamentária. Em contra partida, foi possível observar que as células neste cultivo 3D cresceram com formação de grupamentos celulares que se assemelhavam ao que se observa em tumores no seu ambiente “in vivo”, à luz da histopatologia. Adicionalmente, Speroni. et al. (2013) comprovaram que tumores de mama humano, cultivados em cultura 3D é possível reproduzir a resposta celular aos efeitos hormonais de estradiol, progesterona, prolactina, de forma consistente com o que se observa “in vivo”. Segundo Speroni. et al. (2013), foi possível concluir, ainda, que o modelo de cultivo 3D responde à ação de hormônios, em um ambiente ideal para se conduzirem estudos das interações célula-célula e célula-estroma, na fase de proliferação celular e organização tumoral em tempo real. Com os dados existentes na literatura e com base nos resultados aqui obtidos, o cultivo 3D mostrou-se ser uma ferramenta prática permitindo empregá-lo como modelo para o estudo “in vitro” das neoplasias mamárias. Adjuntamente, permitiu a realização de ensaios biomoleculares, bem como, aqueles relativos ao efeito de um quimioterápico. É possível, ainda, que este modelo de estudo possa ser utilizado em outras pesquisas na oncologia veterinária.

Avaliação da imunomarcção de p53 nos cultivos em monocamada e 3D

Fatores genéticos, também, podem ser responsáveis para o desenvolvimento da neoplasia mamária em cães. Dentre os mais estudados, são os que buscam a compreensão das mutações genéticas, principalmente,

àquelas relativas ao gene TP53 e, conseqüentemente, à sua proteína transcrita (p53) (OLIVER et al., 2006).

Ao ser analisada a expressão da proteína p53, observou-se marcações nuclear e citoplasmática, com a utilização de ambas as técnicas. Embora fosse esperado observar, apenas, a marcação nuclear (WALERYCH et al., 2012), é possível que a técnica de IF seja a mais sensível, pois, por ela, observou-se também a marcação citoplasmática da p53, conforme, também, descreveram Mantesso et al. (2000). Na comparação das técnicas de IF e IC não foi observada a imunomarcação na IC, da p53 na amostra do carcinoma papilar em cultivo de AP, ao contrário do observado na IF.

A marcação citoplasmática pode sinalizar a disfunção dessa proteína, como, também, estar relacionada com a ocorrência de mutação ou instabilidade genética por outros mecanismos, ainda não esclarecidos (TEIXEIRA et al., 2011). As atividades citoplasmática e mitocondriais da p53 mutante, em regular a apoptose, foram recentemente descritas (CHEE et al., 2013; FRANK et al., 2011; MORSELLI et al., 2008). Chee et al, (2013) hipotetizaram sobre a incapacidade da p53 (através de mutação e/ou localização citoplasmática) em manter a homeostase celular, devido à transativação inapropriada de genes alvo envolvidos em processos como parada do ciclo celular e apoptose. Ou seja, as células em cultivo que apresentaram marcação citoplasmática, poderiam apresentar mutação, que ocorreu ao longo das passagens e sob a condição de cultivo 3D. Isto foi observado em todas as amostras incluídas neste estudo, independente da classificação em grau histológico. No entanto, a maior porcentagem das neoplasias estudadas foi classificada em graus II (20%) e III (50%), sendo possível, inferir que a expressão da p53 mutada, pode ocorrer em neoplasias mamárias com maior potencial de malignidade. Ao fazer-se uma associação com o estadio clínico, reconhece-se que as amostras foram oriundas de pacientes em estágio intermediário de evolução da doença clínica e, que tal achado, pode estar associado à progressão maligna, metástase e mau prognóstico.

A proteína p53, quando expressa do citoplasma, pode interagir também com as caspases da via intrínseca da apoptose (caspases 2, 3, 9), que ocorre na mitocôndria. A caspase 3, normalmente é desviada para uma via rápida. Nesta via, a sua ativação cliva e ativa a caspase 6 que, então, cliva a caspase 8. A caspase 8 ativada, tem por função clivar a caspase 3, completando, assim, a via intrínseca, induzindo a morte celular programada. A proteína p53 pode inibir a caspase 9 inibindo o início da ativação da via das caspases, junto com outras proteínas, como XIAP e Bcl-2L (CHEE et al., 2013).

A caspase 3 não esteve expressa nas células dos cultivos de BP oriundas das neoplasias de mama, após o tratamento quimioterápico. Este resultado pode estar relacionado à ocorrência da clivagem da caspase 3 pela caspase 8, induzindo a morte celular. Tal fato foi demonstrado pela redução do número dos esferoides após o tratamento com a carboplatina, e comprovado pela observação da imunomarcagem da p53, na tentativa de proteger o genoma (SONG et al., 2007). Ressalta-se que o limiar da apoptose celular com níveis elevados da p53 no citoplasma, pode permitir com que fármacos quimioterápicos não consigam induzir a morte celular (CHEE et al., 2013).

Atualmente, a p53 é um dos supressores de neoplasias e inibidores do crescimento celular mais bem estudados. Além do que já foi exposto, esta proteína pode ser ativada por várias outras vias, como por exemplo, o estresse oxidativo ou danos ao DNA, que iniciam a parada irreversível do ciclo celular, denominado como senescência (VOUSDEN et al., 2009). O impacto dos níveis de expressão da proteína da p53 sobre a atividade funcional no carcinoma de mama tem um significado expressivo para prognóstico, porém, ainda não bem esclarecido. Da mesma forma, existem outras mutações identificadas, nessa proteína sem relevância funcional, mas que possuem uma função específica no comportamento maligno dos carcinomas (MOLDOVAN et al., 2007; LEE et al., 2004).

Análise molecular para os marcadores da apoptose no cultivo 3D em BP

O Bcl-2, como proteína antiapoptótica, inibe a morte celular quando estimulada por quimioterápicos e irradiação. A proteína pró-apoptótica Bax, também membro da família Bcl-2, induz à morte celular. A ativação da Bax leva a apoptose que está relacionada às caspases 8, 9 e a caspase efetora 3, sendo que esta última degrada a maioria das proteínas celulares (KLOPFLEISCH et al., 2011). Essas duas proteínas, Bax e Bcl-2, equilibram-se e determinam a morte celular ou sobrevivência e longevidade das células conforme os estímulos apresentados. Com relação aos resultados encontrados, verificou-se que o gene Bax foi expresso em todas as neoplasias de AP sob ação da carboplatina, assim como as caspase 8 e 9. Isto indica que essas células estavam entrando em apoptose pela via intrínseca (via mitocondrial). A caspase 2, da mesma forma que a caspase 3, não foi expressa nas amostras após o tratamento, o que sugere que a carboplatina age sobre os mecanismos de indução da ativação da caspase 2, promovendo a morte celular. Essa caspase também pode efetuar a clivagem da Bid, provocando a liberação do citocromo c das mitocôndrias. O citocromo c é liberado após a ativação da caspase 2, sendo mediado pela p53, mas não resulta na ativação das caspases 3 ou 9, conforme ilustrado no esquema da apoptose apresentado no item 2.6 (BAPTISTE et al., 2008). Porém, a liberação do citocromo c pode ocorrer com a ativação da Bax pela caspase 8, conforme mencionado anteriormente. A caspase 2 pode funcionar como uma caspase efetora adicional durante a execução da apoptose, porém, sua atividade pode ser substituída por outras vias da apoptose, tornando-a desnecessária (BAPTISTE et al., 2008; GAO et al., 2005; GUO et al., 2002).

Efeito da carboplatina no cultivo 3D de BP

A maioria dos fármacos antitumorais agem induzindo a apoptose e, em algumas neoplasias, eles podem induzir ao desenvolvimento de mecanismos de resistência celular, para driblar as vias de morte celular programada, pela expressão de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (REED, 2008; BETTAIEB et al., 2003). Observou-se que a maioria dos tumores incluídos neste estudo,

expressou o gene Bcl-2, conforme descrito anteriormente (UWANO et al., 2012). Isto reforça o conceito de que as células das neoplasias mamárias estabelecem mecanismos de sobrevivência, pois do contrário, não seriam encontrados esferoides nos cultivos 3D após o tratamento. Na literatura, existem relatos de que a proteína Bcl-2 impede a apoptose desencadeada por danos genotóxicos, por glicocorticoides e por fármacos quimioterápicos. Alta expressão da Bcl-2 é descrita em neoplasias caninas e estão relacionadas aos processos de expansão neoplásica das células, além de inibirem a ação terapêutica de quimioterápicos (WACHECK et al., 2003; UWANO et al., 2012). Este pode ser o motivo pelo qual os esferoides diminuíram de tamanho, porém, não regrediram por completo em todos os cultivos 3D tratados com carboplatina. Assim, já fora descrito que os quimioterápicos em cultivos 3D, geralmente, podem ter sua ação reduzida, comparativamente à sua ação em culturas em monocamada (HORNING et al., 2008). Não foi possível concluir por isto neste estudo, e de forma comparativa, uma vez que tais ensaios não foram conduzidos em cultura de monocamada.

A carboplatina é capaz de induzir a apoptose de células tumorais ligando-se em receptores da morte celular e, também, pela via mitocondrial (HANIGAN et al., 2003; BOULIKAS et al., 2003). Wang et al. (2006) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, e propuseram que a atividade pró-apoptótica de agentes quimioterápicos, como a carboplatina, ocorre independente da interferência dos receptores de morte celular programada existentes na membrana celular, restando, portanto, a ação do quimioterápico por via mitocondrial (WANG et al., 2006). No tratamento com carboplatina há danos ao DNA, que resultam em um processo longo e complexo de morte celular. E ainda, trata-se de um fármaco não específico que não reage apenas com DNA, mas também com proteínas citoplasmáticas. Por esta razão, é possível considerar a possibilidade de que, em alguns casos, a carboplatina induz a apoptose por danos causados às proteínas que, conseqüentemente, ativariam as caspases efetoras (caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10).

Embora a apoptose e necrose constituam-se em mecanismos de morte celular distintas, com diferentes características morfológicas e bioquímicas, já foram relatados os dois tipos de morte simultaneamente em tecidos ou culturas de células expostas à carboplatina (PESTELL et al., 2000; GONZALEZ et al., 2001). Doses elevadas da carboplatina podem danificar as moléculas envolvidas no fornecimento de energia celular, ou seja, o aporte de ATP. Sendo assim, as proteínas que estão direta ou indiretamente envolvidas no processo de apoptose (como a p53, a Bax, a Bcl-2, e as caspases) também podem induzir à necrose e morte celular. (GONZALEZ et al., 2001).

Os resultados do presente trabalho não permitem identificar o exato mecanismo pelo qual a carboplatina levou à morte das células oriundas das neoplasias mamárias, mas é possível considerar que a expressão do gene Bcl-2 pode ser o responsável pelo mecanismo de resistência observada a este fármaco. E que, possivelmente, as células morreram não apenas pela ativação da apoptose, mas, também, por morte celular iniciada pelo processo de necrose.

Por fim, observou-se que o cultivo 3D representa mais uma nova opção de cultivo celular a ser aplicado em estudos da oncologia veterinária, onde é possível estudar aspectos da carcinogênese em um microambiente celular, semelhante ao que ocorre nos tecidos “in vivo”.

VII. CONCLUSÃO

Com base nos resultados e sob as condições aqui adotadas, pode-se concluir que:

1. Foi possível estabelecer uma padronização do cultivo 3D de neoplasias mamárias caninas, a partir de linhagens de cultura contínuas, por até 58 passagens, indicando-o como modelo a ser empregado em estudos biomoleculares e ensaios quimioterápicos;
2. Foi possível realizar análises citológicas por IF e IC, bem como, moleculares em células de neoplasias mamárias cultivadas em cultura em monocamada e 3D;
3. As células de neoplasias mamárias, cultivadas em 3D, formam esferoides no decorrer de 28 dias de cultivo;
4. A carboplatina é capaz de agir em cultura de neoplasia mamária canina em sistema 3D, e a morte celular pode ter ocorrido pela ativação da apoptose, em que estiveram envolvidos os genes Bax e das caspases 8 e 9;
5. Houve heterogeneidade entre as imunomarcações da p53 no cultivo em monocamada e em seu respectivo cultivo 3D;
6. O carcinoma sólido e carcinoma de células escamosas apresentaram resistência à carboplatina, indicando ocorrer a deflagração de mecanismos de resistência das células neoplásicas aos fármacos, uma vez que houve a expressão de Bcl-2.
7. A caspases 2 e 3 não são expressas em células oriundas de neoplasias mamárias em cultura 3D, quando tratadas com carboplatina. Sugere-se que este fármaco induza morte celular programada por outras vias, não estudadas aqui.

VIII. REFÊNCIAS

ABBOTT, D. R.; ABBOTT, R.T.; JENSON, S.D.; FILMORE, G.C.; ELENITOBA-JOHNSON, K.S.J.; LIN, M.S. Apoptosis of t- (14;18)-positive lymphoma cells by a Bcl-2 interacting small molecule. **Journal of Hematopathology**; v.2, n.2, p.113-119, 2009.

BAKER, E.L.; SRIVASTAVA, J.; YU, D.; BONNECAZE, R.T.; ZAMAN, M.H. Cancer Cell Migration: Integrated Roles of Matrix Mechanics and Transforming Potential. **PLoS ONE** v.6,n.5, p.e20355, 2011.

BENTUBO, H.D.L., SOBRAL, R.A., UBUKATA, R., HONDA, S.T., XAVIER, J.G. Carcinoma inflamatório de mama em cadela - relato de caso. **Clínica Veterinária**, v.65, p.40-44, 2006

BAPTISTE-OKOH, N.; BARSOTTI, A.M.; PRIVES, C.A. Role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.105, n.6, p.1937–1942, 2008.

BARONE, R. Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques, Tomo IV- Esplanchnologie II. **Paris, Édition Vigot**. 2e édition p.449-500, 1999.

BERTAGNOLLI, A.C.; CASSALI, G.D.; GENELHU, M.C.L.S.; COSTA, F.A.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONCALVES, P. B. D. Immunohistochemical Expression of p63 and DNp63 in Mixed Tumors of Canine Mammary Glands and Its Relation with p53 Expression. **Veterinary Pathology** v.46, n.3, p.407–415, 2009.

BETTAIEB, A.; DUBREZ-DALOZ, L.; LAUNAY, S.; PLENCHETTE, S.; REBE, C.; CATHELIN, S.; & SOLARY, E. Bcl-2 proteins: targets and tools for chemosensitisation of tumor cells. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**. v.3, n.4, p.307-318, 2003.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncology Reports**. v.10, n.6, p.1663-82. 2003.

BRODY; R.S.; GOLDSCHMIDT; M.H.; ROSZEL; J.R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**.v.19, p.61-69, 1983

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; GHEVER, C.; SOBRAL, R.A.; AMORIM, R.L.; GAMBA, C.O.; DAMASCENO, K.A.; AULES, P.A.; MAGALHÃES, G.M.; SILVA, J.O.; RAPOSO, J.B.; FERREIRA, A.M.R.; OLIVEIRA, L.O.; MALM, C; ZUCCARI, D.A.P.C.; RIBEIRO, L.G.R.; CAMPOS, L.C.; SOUZA, C.M.; LEITE, J.L.; SOARES, L.M.C.; CAVALCANTI, M.F.; FONTELES, Z.G.; SCHUCH, I.D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T.S.; TERRA, E.M.; CASTANHEIRA, T.L.L.; FELIX, A.O.C.; CARVALHO, G.D.; GUIM, T.N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S.C.; MAIA, F.C.L.; DAGLI M, L.Z.; ROCHA, N.S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J.P.; SILVA, S.M.M.S.; BEZERRIL, J.E.; FREHSE, M.S. & CAMPOS, C.B. Consensus for the diagnosis; prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**; v.4, n.2, p.153-180, 2011.

CERTO, M.; DEL GAIZO MOORE, V.; NISHINO, M.; WEI, G.; KORSMEYER, S.; ARMSTRONG, S. A.; AND LETAI, A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. **Cancer Cell**. n.9, n.5, p. 351-365, 2006.

CHEE, J.L.; SAIDIN, S.; LANE, D.P.; LEONG, S.M.; NOLL, J.E.; NEILSEN, P.M.; PHUA, Y.T.; GABRA, H.; AND LIM, T.M. Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9. **Cell Cycle**. v.12, n.2, p.278–288, 2013.

COLLAVIN, L.; LUNARDI, A.; DEL SAL, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. **Cell Death and Differentiation**; v.17, n.6, p.901-911, 2010.

DEGLI ESPOSTI, M.; DIVE, C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. **Biochem Biophys Research Commun**.v.304, n.3, p.455–461, 2003.

DELLMANN, H.D, CARITHERS, J.R. Citology and Microscopic Anatomy. **Williams & Williams**. p.338-340, 1996

DEL PUERTO, H.L.; MARTINS, A.S.; MORO, L.; MILSTED, A.; ALVES, F.; BRAZ, G.F.; VASCONCELOS, A.C. Caspase-3/-8/-9; Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum; lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus. **Genetics and Molecular Research**. v.9, n.1, p.151-161, 2010.

DEYOUNG, M.P.; ELLISEN, L.W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene**. v.26, n.36, p.5169-5183, 2007.

EHRLICH, M. DNA methylation in cancer: too much; but also too little. **Oncogene**. v.21,n.35, p.5400–5413, 2002.

ELLIOTT, N.T.; YUAN, F.A. Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.100, n.1 ,p.59.74, 2011.

ELSTON C.W. & ELLIS I.O. 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**. v.19, n.5, p.403-410, 1991.

FRANK, A.K.; PIETSCH, E.C.; DUMONT, P.; TAO, J.; AND MURPHY, M.E. Wild type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. **Cancer Biology. Therapy.** v.11, n.8, p.740–745, 2011.

FEDER-MENGUS, C. et al. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? **Trends Molecular Medicine**, v. 14, n. 8, p. 333 - 340, 2008.

FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. **New York: Wiley-Liss**, ed. 4, p. 397, 1994.

GALDERISI, F.; STORCK, L.; LI, J.; MORI, M.; MONGOUE-TCHOKOTE, S.; HUANG, J. Flow Cytometric Chemosensitivity Assay As A Predictive Tool of Early Clinical Response in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Pediatric Blood Cancer.** v.53, n.4, p.543–550, 2009.

GAO Z, SHAO Y, JIANG X. Essential roles of the Bcl-2 family of proteins in caspase-2-induced apoptosis. **The Journal of biological chemistry**; v.280, p.38271-5. 2005.

GASCO, M.; SHAMI, S.; CROOK, T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research.** v.4, p.70–76, 2002.

GAVATHIOTIS, E.; SUZUKI, M.; DAVIS, M. L.; PITTER, K.; BIRD, G. H.; KATZ, S. G.; TU, H.C.; KIM, H.; CHENG, E. H.Y.; TJANDRA, N.; AND WALENSKY, L. D. BAX activation is initiated at a novel interaction site. **Nature.** v.455, n.7216, p.1076-1081, 2008.

GREGORY, C.D.; POUND, J.D. Microenvironmental influences of apoptosis “in vivo” and in vitro. **Apoptosis.** v.15, n.9, p.1029-49,2010.

GREGORY, C.D.; POUND, J.D. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. **Journal of Pathology**. v.223, n.2, p.177–194, 2011.

GRIFFITH, L.G.; SWARTZ, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.7, p.211–224, 2006.

GONZALEZ, V. M., FUERTES, M. A., ALONSO, C., & PEREZ, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001.

GUO Y, SRINIVASULA SM, DRUILHE A, FERNANDES-ALNEMRI T, ALNEMRI ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. **The Journal of biological chemistry**. v.277, p.13430-7. 2002.

HANIGAN, M.H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Therapy**. v.1, p.47-61, 2003.

HELLMEN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **Journal of Dairy Research**. v.72, n.1 suppl, p.90–97, 2005.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v.407, n.6805, p.770-776, 2000.

HORNING, J.L., SAHOO, S.K., VIJAYARAGHAVALU, S., DIMITRIJEVIC, S., VASIR, J.K., et al. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. **Molecular Pharmaceutics**. v. 5, p. 849–862, 2008.

JACKSON-GRUSBY, L.; BEARD, C.; POSSEMATO, R.; TUDOR, M.; FAMBROUGH, D.; CSANKOVSKI, G.; DAUSMAN, J.; LEE, P.; WILSON, C.; LANDER, E.; JAENISCH, R. Loss of genomic methylation causes p53-dependent

apoptosis and epigenetic deregulation. **Nature Genetics**.v.27,n.1, p.31–39, 2001.

JOSLYN, K.; BRUNELLE ANTHONY, L. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **Cell Science at a Glance**. v.122, n.4, p.437-441, 2009.

KALLURI; R. Basement membranes: structure; assembly and role in tumor angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**. v.3, n.6, p.422-33, 2003.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T.C. AND DESSIRIS, A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of Veterinary Medicine. A; Physiology; Pathology; Clinical Medicine**. v.48, n.2, p.85–96, 2001.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer** v.7,n.17, p.573–584, 2007.

KIM, J.B.; STEIN, R.; O'HARE, M.J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer – a review. **Brest Cancer Research and Treatment**. v.85, n.3, p.281–291, 2004.

KLOPFLEISCH, R.; EULER, H.; SARLI, G.; PINHO, S.S.; GÄRTNER, F.; GRUBER, A.D. Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. **Research in Veterinary Science**. v.48, n.1, p.98-11, 2011.

KLOPFLEISCH, R.; GRUBERA, D. Differential expression of cell cycle regulators p21; p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in Veterinary Science**.v.87,n.1, p.91-96,2009.

KLOPFLEISCH, R.; SCHUTZE, M.; GRUBER, A.D. Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases. **Research in Veterinary Science**. v.88, n.2, p.300-303, 2010.

KORSMEYER, S. J. Bcl-2 gene family and regulation of programmed cell death. **Cancer Research**. V.59, n.7suppl , p.1693-1700, 1999.

KUMARAGURUPARAN R; PRATHIBA D; NAGINI S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA; Bcl-2; p53; cytokeratin and ER in mammary tumours. **Research in Veterinary Science**. v.81, n.2, p, 218–224, 2006.

KUMARAGURUPARAN, R; KABALIMOORTHY, J; NAGINI, S. Correlation of lipidperoxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. **Clinical Biochemistry**. v.38, n.2, p.154– 8, 2005.

LEE, C.H.; KIM, W.H.; LIM, J.H.; KANG, M.S.; KIM, D.Y.; KWEON, O.K. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal Veterinary Science** v.5, n.1, p.63–69, 2004.

LI, L.; LU, Y. Optimizing a 3D Culture System to Study the Interaction between Epithelial Breast Cancer and Its Surrounding Fibroblasts. **Journal of Cancer**. v.2, p.458-466, 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN,T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **METHODS**. v.25, p.402–408, 2001.

LOVELL, J. F.; BILLEN, L. P.; BINDNER, S.; SHAMAS-DIN, A.; FRADIN, C.; LEBER, B. AND ANDREWS, D. W. Membrane binding by tBid initiates an

ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. **Cell**. v.135, n.6, p.1074-1084, 2008.

LUO, X.; ZOU; H.; SLAUGTER; C.; WANG, X. Bid; a Bcl2 Interacting Protein; mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**. v.94, n.4, p.481:490, 1998.

MANTESSO, A., LODUCCA, S.V., JAEGER, R.G., PINTO, D.S., ARAÚJO, V.C. Analysis of epithelial-mesenchymal carcinoma based on the establishment of a novel cell line. **Oral Oncology**. v.39, p.453-458.

MARCONATO L, ROMANELLI G, STEFANELLO D, GIACOBONI C, BONFANTI U, BETTINI G, FINOTELLO R, VERGANTI S, VALENTI P, CIARAMELLA L, ZINI E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. n.235, p.967–972, 2009.

MIKOS, A.G.; HERRING, S.W.; OCHAREON, P.; ELISSEEFF, J.; LU, H.H.; KANDEL, R.; SCHOEN, F.J.; TONER, M.; MOONEY, D.; ATALA, A.; VAN DYKE, M.E.; KAPLAN, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineering complex tissues. **Tissue Engineering**. v.12, n.12, p.3307–3339, 2006.

MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B; JENTSCH, S. PCNA the maestro of the replication fork. **Cell**. 129, n.4, 665–679, 2007.

MORALES, J.; ALPAUGH, M. Gain in cellular organization of inflammatory breast cancer: A 3D in vitro model that mimics the “in vivo” metastasis. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 462, 2009.

MORSELLI, E.; TASDEMIR, E.; MAIURI, M.C.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; CRIOLLO, A.; VICENCIO, J.M.; SOUSSI, T.; AND KROEMER, G. Mutant p53

protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. **Cell Cycle** v.7, n.19, p.3056–3061, 2008.

MOUBARAK, R.S.; YUSTE, V.J.; ARTUS, C.; BOUHARROUR, A.; GREER, P.A.; MURCIA, J.M.; SUSIN, S.A. Sequential activation of poly (ADP-ribose) polymerase 1; calpains; and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. **Molecular and Cellular Biology** v.27, n.13, p. 4844–4862, 2007.

NAGAMATSU, K.; TSUCHIYA, F.; OGUMA, K.; MARUYAMA, H.; KANO, R.; & HASEGAWA, A. The effect of small interfering RNA (siRNA) against the Bcl-2 gene on apoptosis and chemosensitivity in a canine mammary gland tumor cell line. **Research in Veterinary Science**. v.84,n.1,p.49-55, 2008.

NELSON, C.M.; BISSELL, M.J. Modeling dynamic reciprocity: Engineering three-dimensional culture models of breast architecture; function; and neoplastic transformation. **Seminars in Cancer Biology**. v.15, n.5, p.342–352, 2005.

NEWSAM, J.M.; KING-SMITH, D.; JAIN, A.; KARANDE, P.; FEYGIN, I.; BURBAUM, J.; GOWRISHANKAR, T.R.; SERGEEVA, M.; MITRAGOTRI, S. Screening soft materials for their effect on skin barrier function by high throughput experimentation. **Journal of Materials Chemistry** v.15, n.30, p.3061–3068, 2005.

OWEN, L. M. TNM Classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**. P.26-32, 1980.

OTT, I., GUST, R. Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** v.7, n.1, p.95–110, 2007.

PATEL, A.; ANDEY, T.; SACHDEVA, M. Evaluation of In Vitro AlgiMatrix™ 3D Cell Culture System as an Alternative to Mammalian Models For Non-small Cell Lung Câncer. **AAPS Journal**. v.8, n.1,p13(S2), 2011.

PEREZ, A.M.D.; PENA, L.; DEL, C. N.; NIETO, A.I. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice**.v.41, n.7, p. 287– 91, 2000.

PESTELL, K. E., HOBBS, S. M., TITLEY, J. C., KELLAND, L. R., WALTON, M. I. Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. **Molecular pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 503-511, 2000.

PINHO, M.S., GULBENKIAN, S. Innervation of the canine mammary gland: an immunohistochemical study. **Journal of Histology & Histopathology**. n.2, p.1175–1184, 2007.

PIETRAS, K.; ÖSTMAN, A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1324-1331, 2010.

POCZOBUTT, J.M., TENTLER, J., LU, X., SCHEDIN, P.J., GUTUERREZ-HARTMANN A. Benign mammary epithelial cells enhance the transformed phenotype of human breast cancer cells. **BMC Cancer**. v. 10, p. 2-17, 2010

QUEIROGA, F; LOPES, C. Tumores mamários caninos: pesquisa de novos fatores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.47, n.543, p.119-127, 2002.

REED, J.C. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. **Blood** v.111, n.7, p.3322–3330, 2008.

RIZVI, I.; CELLI, J.P.; EVANS, C.L.; ABU-YOUSIF, A.O.; MUZIKANSKY, A.; POGUE, B.W.; FINKELSTEIN, D.; HASAN, T. Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. **Cancer Research**. v.70, n.22, p.9319-28, 2010.

SILVER, I.A. The anatomy of the mammary gland of the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice** n.7, p.689–296, 1966.

SIMON; D.; SCHOENROCK; D.; BAUMGARTNERW; NOLTE; I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal Veterinary Internal Medicine**; v.20, n.5, p,1184–1190, 2006.

SNIADECKI, N.J.; DESAI, R.A.; RUIZ, S.A.; CHEN, C.S. Nanotechnology for cell-substrate interactions. **Annals of Biomedical Engineering**. v.34, n.1, p.59–74, 2006.

SONG, T.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; DONG, J.; CAI, W.; GAO, J.; & HONG, B. miR-708 promotes the development of bladder carcinoma via direct repression of Caspase-2. **Journal of cancer research and clinical oncology**; 1-10, 2013.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. The 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. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinical Small Animal**. Practice v.33, n.3, p.573–96, 2003.

SOUZA, C.M.; GAMBA, C.D.E.O.; CAMPOS, C.B.; LOPES, M.T.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P.; CASSALI, G.D. Carboplatin delays mammary cancer 4T1 growth in mice. **Pathology Research and Practice**. V.209, p.24-9, 2012.

SPERONI, L., WHITT, G. S., XYLAS, J., QUINN, K. P., JONDEAU-CABATON, A., BARNES, C., GEORGAKOUDI, I., SONNENSCHNEIN, C., SOTO, A. M. Hormonal Regulation of Epithelial Organization in a Three-Dimensional Breast Tissue Culture Model. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 20, n. 1, p. 42-51, 2013.

STANCHEVA, I.; MEEHAN, R.R. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. **Genes & Development Journal**. v.14, n.3, p.313–327, 2000.

TEIXEIRA, M.J.D.; SOBRAL, A.P.V.; ABREUE-LIMA, M.C.; MAIA, F.C.L.; CHRISTILIS, M.; SOUZA, D.M.B.; ADRIÃO, M.; AUREA WISCHRAL, A. Evaluation of immunohistochemical over expression of p53 protein and of mutations in exon 8 of *Tp53* gene in canine mammary carcinomas and normal mammary glands. **Veterinary Research**. v.31, n.6, p.521-526, 2011.

UWANO, M.; KANO, R.; MARUYAMA, H.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. Therapeutic Efficacy of ABT-737; a Bcl-2 Inhibitor; in a Canine Melanoma Cell Line. **Journal Veterinary Medicine**. v.74, n.6, p.783-785, 2012.

VOUSDEN, K.H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell** v.137, n.3, p.413–431, 2009.

WACHECK, V.; LOSERT, D.; GÜNSBERG, P.; VORNLOCHER, H. P.; HADWIGER, P.; GEICK, A.; PEHAMBERGER, H.; MÜLLER, M. AND JANSEN, B. Small interfering RNA targeting bcl-2 sensitizes malignant melanoma. **Oligonucleotides** 13: 393–400, 2003.

WEI, M.C.; ZONG, W.X.; CHENG, E.H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; AND KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**. v.292, n.5517, p.727-730, 2001.

WILLIS, S. N.; AND ADAMS, J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis **Current Opinion in Cell Biology**. v.17, n.6, p. 617-625, 2005.

WILLIS, S. N.; FLETCHER, J. I.; KAUFMANN, T.; VAN DELFT, M. F.; CHEN, L.; CZABOTAR, P. E.; IERINO, H.; LEE, E. F.; FAIRLIE, W. D.; BOUILLET, P.; STRASSER, A.; KLUCK, R.M.; ADAMS, J.M.; HUANG, D.C.S. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs; not Bax or Bak. **Science**. v.315, n.5813, p.856-859, 2007.

VREMEULEN, K. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targents in Cancer. **Cell Proliferation**, n. 36, p. 131-149, 2003.

YAMADA, K.M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell** v.130, n.4, p.601–610, 2007.

YAMAGUCHI, H.; AND WANG, H. G. Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubuledamaging agents by p53 transcription dependent and independent pathways. **Journal Biology Chemistry**. v.277, n.38, p.41604-41612, 2004.

YING; S.; HÄCKER; G. Apoptosis induced by direct triggering of mitochondrial apoptosis proceeds in the near-absence of some apoptotic markers. **Apoptosis**. v.12, n.11, p.2003-2011, 2007.

YOKOCHI, T.; ROBERTSON, K.D. Preferential methylation of unmethylated DNA by mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.14, p.11735–11745, 2002.

XIE, GUOZHU et al. Mammosphere cells from high-passage MCF7 cell line show variable loss of tumorigenicity and radioresistance. **Cancer letters**, v. 316, n. 1, p. 53-61, 2012.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E; ROCHA, N.S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas. **Clínica Veterinária**, n.2, p.50-54, 2001.

APÊNDICE A

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética em Experimentação Animal seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.



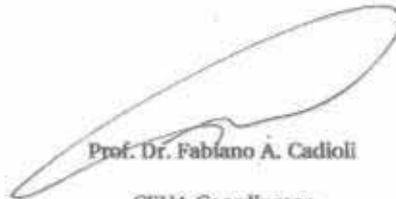
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Carcinoma mamário tubulopapilífero de cadelas: correlações *in vivo* e *in vitro*" sob responsabilidade do Pesquisador ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE e colaboração de Tereza Cristina Cardoso da Silva está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 02070-2011.

CERTIFICATE

We certify that the research "Canine tubulopapillary carcinoma. *In vivo* versus *in vitro* correlations", protocol number 02070-2011, under responsibility of ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE and with collaboration of Tereza Cristina Cardoso da Silva agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
CEUA Coordinator