

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**TUMOR MAMÁRIO CANINO: ESTUDO *IN VITRO*,
IMUNOMARCAÇÃO E AÇÃO DA DOXORRUBICINA**

Silmara Sanae Sakamoto de Lima

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**TUMOR MAMÁRIO CANINO: ESTUDO *IN VITRO*,
IMUNOMARCAÇÃO E AÇÃO DA DOXORRUBICINA**

Silmara Sanae Sakamoto de Lima

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

2013

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

Sakamoto - Lima, Silmara Sanae

C991t Tumor mamário canino: estudo in vitro, imunomarcção e ação da doxorubicina / Silmara Sanae Sakamoto - Lima.

Araçatuba: [s.n], 2013

89f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientador: Prof Adj. Alexandre Lima de Andrade

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

1.Neoplasias mamárias- cães 2. Doenças do cão. 3. Técnicas de culturas celulares 4. Quimioterapia 5. Doxorubicina

CDD 636.7999449



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Tumor mamário canino: estudo in vitro, imunomarcacão e ação da doxorubicina.

AUTORA: SILMARA SANAÉ SAKAMOTO DE LIMA

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. SABRYNA GOUVEIA CALAZANS

Dra. MARIA GISELA LARANJEIRA

Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO

Dra. PAULA RAHAL

Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

DATA DA REALIZAÇÃO: 9 de agosto de 2013.

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SILMARA SANAE SAKAMOTO - nascida em 17 de junho de 1983 no município de São Paulo – SP. Coursou o ensino fundamental na Cooperativa de Ensino de Araçatuba (COOESA) e o ensino médio no Colégio Anglo de Araçatuba. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – SP da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” em 2002 e, formou-se no ano de 2006. Durante a graduação, participou de estágios de iniciação científica nas disciplinas de Patologia Geral Veterinária, Farmacologia e Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e, de projeto de extensão universitária, no Projeto de Castração de Cães e Gatos, como bolsista “PROEX”. Realizou Residência na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na UNESP-Araçatuba, de 2007 a 2009. Realizou o mestrado em Ciência Animal na UNESP-Araçatuba, com obtenção do título de mestre em 2011. Iniciou o curso de doutorado em Ciência Animal na UNESP-Araçatuba, no ano de 2011, com ênfase na área de oncologia veterinária.

EPÍGRAFE

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

(Charles Chaplin)

*"Se é para criticar (os outros), cale-se.
Se é para reclamar, dê sugestão.
Se é para buscar culpados, busque solução.
Se é para se fazer de vítima, faça-se vencedor.
Se é para justificar seus erros, aprenda com eles.
Se é para julgar as pessoas, julgue suas atitudes."*

(Paulo Vieira)

DEDICATÓRIA

*À meus pais Shigueaki e Kazuko,
Ao meu marido Leandro Kanamaru.*

*Não existem palavras que possam traduzir toda a minha gratidão e
felicidade por vocês existirem em minha vida!*

AGRADECIMENTOS

À Deus. Pela vida, pelas pessoas e pelas oportunidades maravilhosas que me foram dadas como um presente a ser sempre lembrado e agradecido.

Aos meus pais, Shigueaki e Kazuko, exemplos a serem seguidos. Vocês são minha estrutura, o meu porto seguro. Vocês foram a força que eu precisei para superar todos os obstáculos pessoais e profissionais. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre me ensinarem a tentar ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido, Leandro Kanamaru pela paciência acima de tudo. Obrigada por ter “doador” grande parte da nossa vida, agora como casados, para o meu doutorado, do princípio ao fim. Você me ensinou a ser menos impaciente, a esperar que as coisas aconteçam naturalmente e, fazer com que eu pare de tentar adivinhar o futuro. Com certeza, todos os nossos esforços e abdições serão em prol de um futuro melhor para nós dois.

Ao meu orientador, Professor Alexandre Lima de Andrade, por sempre confiar em mim como profissional e, pela incrível convivência durante esses anos, da graduação ao doutorado. Vou sempre me lembrar dos seus elogios e também dos momentos em que foi necessária uma bronca. Foi ao seu lado que pude crescer profissionalmente e sua alegria de viver é força para os momentos de desânimo. Sem dúvida, a sua companhia no congresso passado foi uma experiência memorável! Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Professora Tereza Cristina Cardoso por ter me aceitado como “orientada” e ter permitido que eu, literalmente, ocupasse todo o seu laboratório com as minhas inúmeras amostras. Com certeza, sem a sua grande ajuda, eu não poderia ter concretizado o doutorado. A senhora foi a luz que sempre me conduziu no embaralhar de minha idéias. Obrigada por participar da fase pré, trans e pós-projeto.

À Professora Maria Cecília Rui Luvizotto pela amizade que se estreitou durante o mestrado. Obrigada pelos conselhos de vida profissional e pessoal e, saiba que, o aprendizado adquirido com a senhora no mestrado foi fundamental para a realização do doutorado. Sou eternamente grata pela sua amizade.

À professora Flávia de Rezende Eugênio por ser um exemplo de profissional e pela amizade. A senhora sempre foi a amiga a quem eu pude confidenciar as angústias profissionais e pessoais e, com sua nata sensatez, fazia com que eu enxergasse o problema e o resolvesse. Foi com a senhora que aprendi a visualizar a aplicação prática da pesquisa e a trabalhar em prol dos animais. A sua amizade foi um dos maiores presentes que ganhei durante a minha vida acadêmica na Unesp.

Às professoras Maria Gisela Laranjeira, Flávia de Rezende Eugênio, Paula Rahal e Sabryna Gouveia Calazans pelas valiosas colaborações concedidas à esta tese no exame geral de qualificação e no processo de defesa.

Aos pós-graduandos Daniela, Heitor e Andréia pela oportunidade em poder conhecê-los melhor durante o doutorado e, por agora, terem se tornados meus amigos e não mais colegas de pós-graduação. Vocês conseguiram tornar mais leve a árdua tarefa de concretizar esse projeto. Ao Heitor e Daniela agradeço ainda pela imensa ajuda na parte experimental.

Aos pós-graduandos Talita, Gabriel e Gui; Juliana e Acácio; Ju Peloi, Caio, Alex e Joana pela amizade e apoio psicológico. Enfrentamos batalhas semelhantes na pós-graduação, mas com certeza, os momentos de descontração fizeram tudo isso valer a pena.

Aos meus Sushi, Riana, Cindy e Pepê, simplesmente por existirem. Vocês são capazes de fazer um problemão virar uma poeirinha insignificante.

Ao Laboratório de Virologia Animal e às funcionárias Cilene e Gilmara.

Ao Hospital Veterinário e à todos os seus funcionários, residentes e animais que fizeram parte deste experimento. Em especial, agradeço à Bia e à Lucila pela amizade, pelos conselhos e por serem pessoas tão especiais e cativantes, ao ponto de nos fazerem passar tardes conversando sem nem perceber o voar das horas.

Às funcionárias da biblioteca Fátima, Alexandra e, em especial, Isabel, pelas correções e por sempre esclarecer minhas dúvidas bibliográficas. E à Michele pela simpatia e ajuda nas cópias e encadernações.

À UNESP-Araçatuba e FMVA pela minha formação profissional e pela estrutura física disponibilizada.

À pós-graduação e todos os seus funcionários.

À CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que por algum motivo não foram citados mas que de alguma forma participaram nessa importante fase de minha vida.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Assunto	Página
I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	17
II REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.2 Neoplasias mamárias.....	19
2.2.1 Diagnóstico e tratamento das neoplasias mamárias.....	20
2.2.2 Quimioterapia na Medicina Veterinária.....	22
2.3 Marcadores moleculares como fatores prognósticos.....	25
2.3.1 Proteína p53	25
2.3.2 Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico (HER-2)	27
2.4 Cultivo celular de tumores mamários de cadelas	29
III OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivos gerais.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
IV MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Seleção dos animais	33
4.2 Obtenção das amostras	33
4.3 Cultivo celular.....	34
4.4 Avaliação imuno-histoquímica e de imunofluorescência.....	39
4.5 Ensaios quimioterápicos	41
4.5.1 Contagem do número de células pelo azul de Tripan.....	42
4.5.2 Contagem celular e viabilidade celular	44
4.5 Análise estatística.....	45
V RESULTADOS.....	46
VI DISCUSSÃO.....	61
VII CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A.....	86
APÊNDICE B.....	87

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – I) Fluxograma da colheita e destino das amostras de tumores mamários de cadelas. II) Esquematização do processo de desagregação mecânica e química dos fragmentos de tumor mamário, seguido por lavagem com tripsina para obtenção de suspensão celular e dos explantes.....37
- FIGURA 2 – Garrafa de cultura de 25 cm². a) Meio de cultivo, suspensão celular e explantes. b) Identificação da amostra e do número da passagem realizada.....38
- FIGURA 3 – Processo de tripsinização. a) Garrafa de cultivo com presença de tapete celular visível (névoa no fundo da garrafa). b) Confluência total do tapete celular. c) Início da ação da tripsina 0,25% com presença de aglomerados celulares que se destacaram (aros). d) Total descolamento do tapete celular. Células encontram-se aglomeradas e soltas junto ao meio. Visualização sob microscopia invertida (40x).....38
- FIGURA 4 – Testes quimioterápicos com a doxorrubicina em diferentes concentrações. I) Frasco-ampola comercial contendo o quimioterápico liofilizado e diluente (água para injeção) e diluições seriadas da doxorrubicina: Controle (DMEM) - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 2,0µM de doxorrubicina (esquerda para direita) já prontos para serem adicionados ao cultivo (acima) e placa de cultivo de 6 poços contendo as células e os tratamentos (abaixo). II) Placas de cultivo (acima) submetidas ao tratamento quimioterápico nas diferentes concentrações por 24 horas e presença de descolamento do tapete celular (setas negras). *Pellet* obtido após processo de centrifugação da suspensão e do tapete celulares das placas tratadas (abaixo).....43
- FIGURA 5 – Esquematização da determinação do número total de células viáveis através da técnica de contagem celular em câmara

hemocitométrica de suspensões celulares coradas com Azul de Tripan.	44
FIGURA 6 – Cadela com tumor misto benigno e carcinoma complexo. I) Ilustração macroscópica do tumor. II) Fotomicrografia da histopatologia (coloração de Hematoxilina e Eosina, microscopia de luz, aumento de 20x). III) Células tumorais mamárias na quinta passagem (microscopia invertida, aumento de 40x). IV) Células tumorais mamárias na quinta passagem (após fixação com metanol e acetona, congelamento a -20°C e coloração com Hematoxilina, microscopia invertida, aumento de 40x).....	47
FIGURA 7 – Cadela com tumor mamário simples (carcinoma tubulopapilífero cístico) e carcinoma mamário de células espinhosas. I) Ilustração macroscópica do tumor. II) Fotomicrografia da histopatologia (coloração de Hematoxilina e Eosina, microscopia de luz, aumento de 20x). III) Células tumorais mamárias na quinta passagem (microscopia invertida, aumento de 40x). IV) Células tumorais mamárias na quinta passagem (após fixação com metanol e acetona, congelamento a -20°C e coloração com Hematoxilina, microscopia invertida, aumento de 40x).....	48
FIGURA 8 – Fotomicrografia em microscopia invertida (40x) de tumores mamários de cadelas na quinta passagem. A) Cultura celular de carcinoma Tubulopapilífero (epitelióide). B) Carcinoma sólido (fibroblastoide). C) Carcinoma anaplásico (misto)	49
FIGURA 9 – Cultura de carcinoma mamário tubulopapilífero nas 1ª, 2ª e 3ª passagens (a,b,c). Observar a mudança no predomínio celular. A primeira passagem contém variados tipos celulares, demonstrando um caráter heterogêneo proveniente dos explantes, o que levou ao aumento do número de dias para atingir a confluência total. Na 3ª passagem, a cultura já se apresentava com uniformidade celular do tipo epitelióide (100% de confluência).....	49

FIGURA 10 – Culturas celulares distribuídas de acordo com o grupo histológico e o número de passagem que cada amostra apresentou até a senescência ou contaminação bacteriana. (TMB= Tumor misto benigno, CC= Carcinoma complexo, CS= Carcinoma simples e CEC= Carcinoma espinocelular).....	50
FIGURA 11 – Fotomicrografia de método imuno-histoquímico em tumor de mama canino de acordo com o imunomarcador (microscopia óptica, aumento 100x).....	52
FIGURA 12 – Fotomicrografia de método de imunofluorescência em tumor de mama canino de acordo com o imunomarcador (microscopia invertida, aumento 40x).....	53
FIGURA 13 – Reação positiva de imunofluorescência do anticorpo anti-vimentina no grupo carcinoma simples (microscopia invertida, aumento 100x). a e b) Carcinoma tubulopapilífero cístico. c) Carcinoma sólido. d) Carcinoma anaplásico.....	54
FIGURA 14 – Imunoexpressão do anticorpo anti-p63 em tumores mamários de cadelas. Técnica de imuno-histoquímica no tumor original (esquerda) e de imunofluorescência (direita) nos respectivo cultivo celular.....	55
FIGURA 15 – a) Gráfico representativo da média de viabilidade celular (%) dos cultivos celulares de tumores mamários de cadelas, após o tratamento com doxorrubicina em diferentes concentrações durante 24 horas. a) Média final de todas as culturas mamárias tumorais (17 amostras). b) Média de acordo com os grupos histológicos (tumor misto benigno, carcinoma complexo e carcinoma simples - 15 amostras).....	57
FIGURA 16 – Gráfico representativo de cada uma das amostras dos grupos tumor misto benigno, carcinoma complexo, carcinoma simples e carcinoma espinocelular. Visualiza-se a diferença nas porcentagens de viabilidades celulares entre os grupos histológicos e entre as amostras de cada grupo, identificando o comportamento	

individual de cada tumor frente à doxorubicina nas diferentes concentrações.....	58
FIGURA 17 – Fotomicrografia de culturas celulares de tumores mamários de cadelas (microscopia invertida, aumento de 40x). Nota-se que quanto maior a concentração do antibiótico, mais intensa é a coloração avermelhada decorrente do acúmulo de doxorubicina no tapete celular e no sobrenadante.....	
	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação histológica dos tumores mamários caninos conforme os critérios da OMS-AFIP (MISDORP et al., 1999).....	21
Tabela 2 – Relação dos anticorpos primários, fabricantes e diluições utilizados.....	40
Tabela 3 - Valores de média ($\bar{x}$), desvio padrão (S) e mediana (Md) da frequência em porcentagem, segundo o método utilizado para cada marcador nos tumores mamários e seus respectivos cultivos.....	51
Tabela 4 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade em escores, segundo o método utilizado para cada marcador nos tumores mamários e seus respectivos cultivos.....	52
Tabela 5 - Valores médios ($\bar{x}$), desvios-padrão (S) e mediana (Md) da viabilidade celular (%) de acordo com a concentração da doxorubicina, nas 17 amostras tumorais mamárias de cadelas.....	56
Tabela 6 - Valores médios ($\bar{x}$), desvios-padrão (S) e mediana (Md) da viabilidade celular (%), segundo a concentração da doxorubicina e o grupo histológico, nas 15 amostras tumorais de cadelas.....	56

TUMOR MAMÁRIO CANINO: ESTUDO *IN VITRO*, IMUNOMARCAÇÃO E AÇÃO DA DOXORRUBICINA

RESUMO – A neoplasia mamária canina representa uma das maiores casuísticas na oncologia veterinária e o emprego de seus respectivos cultivos celulares são importantes, principalmente, na área terapêutica. Assim, o objetivo do presente estudo foi padronizar e estabelecer cultivos celulares de tumores mamários caninos para testes *in vitro* com doxorubicina e, correlacionar imunomarcações com vimentina, citoqueratina, p53 e HER-2 no tumor original e nas células do seu cultivo. Tumor misto benigno e os carcinomas complexo, simples e espinocelular foram cultivados a partir de explantes com posterior exposição das células à doxorubicina (controle–0,25–0,50–0,75–1,0–2,0 μ M). A viabilidade celular foi mensurada pelo azul de Tripán e os testes com imunomarcadores para cada espécie tumoral foram por imunohistoquímica e, no cultivo, pela imunofluorescência. Do total de 39 amostras, 40% foram cultivadas até a quinta ou mais passagens. As imunomarcações não foram expressas de forma similar entre as técnicas, com diferença significativa na frequência de vimentina, p53 e HER-2, de forma aumentada nos cultivos. A doxorubicina apresentou alta eficácia nas células tumorais, mas sem diferença entre os tipos histológicos, porém cada cultivo comportou-se distintamente quando analisado em isolado. Conclui-se que é possível cultivar primariamente diferentes tumores mamários caninos utilizando-se meio de cultivo básico; os testes de expressão gênicas são mais indicados para análises comparativas entre tumor e seu respectivo cultivo e, quanto maior a concentração do quimioterápico, menor a viabilidade celular.

Palavras - Chave: doenças do cão, neoplasias mamárias, técnicas de culturas celulares, quimioterapia, doxorubicina

CANINE MAMMARY GLAND TUMOR: STUDY OF CELL CULTURE, IMMUNOEXPRESSION AND DOXORUBICIN ACTIVITY

SUMMARY – Canine mammary tumors represent a high casuistry in veterinary oncology and few studies with cell culture are being employed, mainly with drug application. The purpose was to establish and standardize the cell culture of canine mammary tumors for *in vitro* efficacy of doxorubicin and to correlate the immunostaining of vimentin, cytokeratin, p53 and HER-2, in paraffin sections of original tumor and the cell cultures derivated. Benign mixed tumor, complex carcinoma, simple carcinoma and espinocelular carcinoma were cultivated from explants and the cells originated were incubated with doxorubicin in different concentrations (control–0.25–0.50–0.75–1.0–2.0 μ M). The percentual of viable cells were determined by the Trypan blue dye exclusion test and for immunoexpression, the immunohistochemistry was performed for the primary tumor and immunofluorescence, for the cells. A total of 39 tumor samples were collected and, 40% were cultivated up to fifth passages. A different imunnoexpression was observed between methodologies with higher expression at vimentin, p53 and HER-2 groups. It was observed that doxorubicin presented an elevated efficacy in canine mammary cell culture but without difference among the histological groups and each sample presented an individual responsiveness for the same treatment. So, it can be concluded that it was possible to realize a primary cell culture with a simple culture medium formulation; gene expression profiles in tumor tissue and cell culture derived from those tumors are better designated than immunoexpression tests and higher the concentration of doxorubicin, lower the cell viability.

Keywords: dog diseases, breast neoplasms, cell culture techniques, drug therapy, doxorubicin

I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os tumores mamários espontâneos em cadelas, assim como em mulheres, são comuns e, correspondem a 50% das neoplasias em fêmeas. No momento do diagnóstico, cerca de metade delas já possuem natureza maligna, principalmente de carcinomas (MORRISON, 1998; QUEIROGA; LOPES, 2002; TODOROVA, 2005).

De caráter multifatorial (MISDORP, 2002; SILVA et al., 2004) e tempo de sobrevida variável, esta é influenciável por múltiplos fatores, como tipo histológico, presença de metástases, estágio da doença e tipo de tratamento empregado (MISDORP, 2002). Sua prevalência vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, constituindo umas das principais causas de óbito na espécie humana e canina (MICHELL, 1999).

A maior expectativa de vida dos animais de companhia é uma das principais causas da crescente incidência dessa afecção. Assim, atualmente o diagnóstico e tratamento dos pacientes oncológicos têm sido realizados de forma mais minuciosa. Pesquisas nessas áreas tornaram-se mais rotineiras pela busca na melhoria da qualidade de vida desses pacientes (LANA, 2007; MORRISON, 1998).

Pela similaridade clínica e histológica entre cadelas e mulheres (HELLMÉN, 2005; SCHNEIDER, 1970), é possível extrapolar os resultados obtidos no diagnóstico e tratamento da mulher para a cadela, com ajustes nas posologias e, também de forma inversa, onde pesquisas nas cadelas são utilizadas como modelos de estudo aplicáveis à mulher (UVA et al., 2009). O modelo animal canino tem resultados mais fidedignos do que àqueles realizados em cobaias de laboratório, devido sua apresentação clínica espontânea, ao contrário daqueles observados em roedores, no qual as neoplasias são induzidas (MOUSER, et al., 2010).

Embora protocolos quimioterápicos geralmente sejam extrapolados do que se pratica como terapia adjuvante em mulheres, as informações publicadas

sobre a sua eficácia em cadelas são limitadas (SIMON et al., 2006). Atualmente, estudos *in vitro* têm sido realizados em substituição àqueles *in vivo*, principalmente por questões éticas e pela maior praticidade na execução com resultados em tempo reduzido. Na área da terapêutica, culturas celulares mamárias têm sido empregadas para avaliar a eficácia de novos medicamentos e padronizar os protocolos a serem utilizados na medicina humana. O cultivo de células mamárias malignas de cadelas também é utilizado em menor escala, apesar de oferecer maiores facilidades na condução de experimentos com a mesma finalidade, principalmente nos testes terapêuticos (PAWLOWSKI et al., 2009; SIMON et al., 2001).

O intuito do presente trabalho foi avaliar a viabilidade em se padronizar uma metodologia que permita cultivar as neoplasias mamárias, e ainda estabelecer linhagens celulares desses tumores primários, já que há pouca disponibilidade das caninas no mercado e a maioria das linhagens comerciais disponíveis é originária de metástases dos tumores primários humanos (BURDALL et al., 2003).

Dessa maneira, uma padronização e manutenção dessas linhagens caninas permitiriam, com a divulgação científica entre aqueles que militam na oncologia veterinária, estabelecer melhores protocolos para o tratamento clínico do tumor de mama canino.

II REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Neoplasias mamárias

Dentre as neoplasias que mais acometem a espécie canina, os tumores testiculares são os mais comuns em machos e os de mama, em cadelas, correspondendo a cerca de 50% dos tumores que ocorrem nas fêmeas (WHITE, 2007).

Diferentes fatores podem influenciar o desenvolvimento dos tumores mamários caninos, sendo os mais importantes a idade, raça e predisposição genética, “status” hormonal e fatores de crescimento, expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e dieta alimentar (DORE et al., 2003; LAVALLE et al., 2009; QUEIROGA et al., 2005; SCHNEIDER et al., 1969; SCHNEIDER, 1970). Alterações pré-malignas e benignas nas glândulas mamárias constituem ainda, fatores promotores de tumor, principalmente na cadeia ipsilateral do mesmo (ARPINO et al., 2005; MOUSER et al., 2010).

Esta doença oncológica ocorre em cadelas de meia idade a idosas (HELLMEN et al., 1993), com maior incidência após os oito anos e com pico entre os nove e 11 anos de idade (HELLMEN et al., 1993; SCHNEIDER, 1970; WHITE, 2007). A incidência da mesma aumenta com a idade com taxa 1% aos seis anos, 6% aos oito e 13% aos 10 anos (EGENVALL et al., 2005). Raças puras, como Poodle, Cocker Spaniel e Dachshund, são apontadas como predispostas (DORN;SCHNEIDER, 1976; SCHNEIDER, 1970; WHITE, 2007; ZATLOUKAL et al., 2005).

De forma inversa, a incidência de neoplasia mamária reduz drasticamente quando a castração é realizada de forma precoce (SARTIN et al., 1993; SCHNEIDER et al., 1969; WHITE, 2007). A frequência dos tumores é de 0,5% quando a ovariossalpingohisterectomia é realizada antes do primeiro cio; de 8% após o primeiro ciclo estral e de 26% após o segundo. A proteção conferida pela castração desapareceria após os dois anos e meio de idade, não exercendo mais atração benéfica (SCHNEIDER et al., 1969).

Acredita-se que 40 a 60% dos tumores mamários malignos possuam receptores de estrógeno e progesterona, alguns, inclusive, apresentando notável crescimento durante os períodos de estro. Os esteroides ovarianos estimulam o crescimento do tecido mamário em condições fisiológicas e esse efeito proliferativo sobre o epitélio poderia também criar condições para o crescimento neoplásico (QUEIROGA et al., 2005).

O efeito da pseudogestação sobre os tumores mamários não foi comprovado em um estudo realizado por Veronesi et al. (2003) em 267 cadelas. Já a administração exógena de progestágenos aumentou a incidência dos mesmos, principalmente dos malignos (STOVRING et al., 1997).

Pior prognóstico e tempo de sobrevida menor correlaciona-se com a enzima COX-2. Com maior expressão nas neoplasias malignas em relação às benignas, a COX-2 estaria envolvida com o desenvolvimento e progressão dos tumores mamários (DORE et al., 2003; LAVALLE et al., 2009; MILLANTA et al., 2006). Em relação ao fator nutricional, a dieta também poderia exercer influência na doença. Constatou-se que a obesidade no primeiro ano de vida, assim como um ano antes do diagnóstico da neoplasia, poderia predispor as fêmeas à ocorrência dos tumores (SONNENSCHNEIN et al., 1991).

2.1.1 Diagnóstico e tratamento das neoplasias mamárias

O diagnóstico definitivo do tumor de mama é obtido pelo exame histopatológico por biopsias excisional, juntamente com tecidos adjacentes sadios, denominados “margens cirúrgicas”. A fim de se padronizar o exame diagnóstico, deve-se adotar uma forma de classificação específica. Os critérios diagnósticos propostos pela OMS – AFIP (Organização Mundial de Saúde - Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas) para tumor de mama são utilizados pela maioria dos laboratórios diagnósticos. Nessa classificação, as neoplasias mamárias caninas são divididas em tumores malignos, benignos, sem classificação, hiperplasia/displasia mamárias, com posterior subdivisão, conforme Tabela 1.

Tabela 1 — Classificação histológica dos tumores mamários caninos conforme os critérios da OMS-AFIP (MISDORP et al., 1999)

1. NEOPLASIAS MALIGNAS	2. NEOPLASIAS BENIGNAS
1.1 Carcinoma In Situ	2.1 Adenoma
1.2 Carcinoma Complexo	Adenoma Simples
1.3 Carcinoma Simples	Adenoma Complexo
Carcinoma Tubular/Tubulopapilífero	Adenoma Basalóide
Carcinoma Sólido	2.2 Fibroadenoma
Carcinoma Anaplásico	Fibroadenoma com baixa celulariedade
1.4 Tipos Especiais de Carcinomas	Fibroadenoma com alta celulariedade
Carcinoma de Células Fusiformes	2.3 Tumor misto benigno
Carcinoma de Células Escamosas	2.4 Papiloma ductal
Carcinoma Mucinoso	3. TUMORES SEM CLASSIFICAÇÃO
Carcinoma Rico em Lipídeos	4. HIPERPLASIAS MAMÁRIAS E DISPLASIAS
1.5 Sarcoma	4.1 Hiperplasia Ductal
Fibrossarcoma	4.2 Hiperplasia Lobular
Osteossarcoma	Hiperplasia Epitelial
Outros sarcomas	Adenose
1.6 Carcinossarcoma	4.3 Cistos
1.7 Carcinoma ou Sarcoma em Tumor Benigno	4.4 Ectasia Ductal
	4.4 Ginecomastia

Ainda, como diagnóstico, as neoplasias devem ser classificadas de acordo com o sistema de estadiamento clínico TNM (Tumor/Linfonodo/Metástases), com critérios segundo a UICC (União Internacional Contra o Câncer). Esta classificação é baseada em três princípios, onde: 1) **(T)**, indica o diâmetro máximo do tumor, 2) **(N)**, o envolvimento de linfonodos regionais e 3) **(M)** a presença de metástases à distância, como auxílio ao prognóstico de vida (APÊNDICE B).

Os animais que apresentem qualquer neoplasia devem ser classificados segundo esse sistema (TNM) para que se tenha um acompanhamento adequado da progressão, regressão ou estacionamento do câncer. O sistema TNM foi adaptado da medicina humana para a veterinária e é considerado como um fator prognóstico validado pelo Colégio Americano de Patologistas (NUNES, 2007; OWEN, 1980).

Em medicina veterinária, como tratamento de eleição, a intervenção cirúrgica deve ser indicada inicialmente para todos os cães, exceto quando há evidência de metástases à distância ou na presença de carcinoma mamário

inflamatório, quando os benefícios do procedimento cirúrgico devem ser avaliados (LANA et al., 2007; WHITE, 2007).

O objetivo da cirurgia tem a cura para alguns casos e o aumento no tempo de sobrevivência ou qualidade de vida do animal (WHITE, 2007). O tratamento cirúrgico pode inibir o crescimento de novos tumores, mas não impede o desenvolvimento de metástases, ainda não identificadas, no momento do diagnóstico. Cada procedimento cirúrgico pode variar de acordo com a escolha do cirurgião em relação à localização, tamanho, quantidade e infiltração local dos tumores, além da probabilidade de cura que pode ser obtida e do estado clínico do paciente (LANA et al., 2007).

Cães com tumores benignos e aproximadamente 50% daqueles com tumores malignos podem atingir a cura com o tratamento cirúrgico de forma isolada. Os demais animais com tumores malignos normalmente já possuem micrometástases e metástases no momento do diagnóstico e tratamento estipulado; portanto, podem evoluir precocemente para a morte (MISDORP, 2002).

Tumores de mama malignos com mais de três centímetros e com maior grau de anaplasia parecem ter maior probabilidade de recidivas (70% em um ano), em relação aos menores e menos anaplásicos (30% em um ano) (O'KEEFE, 1997). A sobrevivência após o tratamento cirúrgico ainda pode estar correlacionada a outras variáveis como: tamanho do tumor, graduação pelo TNM, presença de metástases em linfonodos e à distância e graduação histológica (CHANG et al., 2005; LANA et al., 2007).

2.1.2 Quimioterapia na Medicina Veterinária

O tratamento com antineoplásicos consiste na aplicação regional ou sistêmica de agentes com capacidade de destruir as células neoplásicas ou interromper a proliferação destas (RODASKI; DE NARDI, 2008). A quimioterapia também vem sendo cada vez mais utilizada como neoadjuvante ou adjuvante em uma grande variedade de tumores em pequenos animais (RANGEL et al., 2009). Para que haja uma maior destruição das células

tumorais, os quimioterápicos devem ser administrados em doses máximas toleradas, durante o menor tempo possível (RODASKI; NARDI, 2008).

Embora na medicina humana, a quimioterapia seja amplamente empregada como adjuvante no tratamento do câncer de mama, na medicina veterinária poucas pesquisas foram divulgadas em cães, com resultados satisfatórios ou até mesmo contraditórios (SIMON et al., 2006; TODOROVA, 2011).

Os protocolos com fármacos antineoplásicos geralmente incluem o 5-fluorouracil, a ciclofosfamida e a doxorrubicina (RUTTEMAN et al., 2001). A quimioterapia adjuvante em cães mastectomizados pode auxiliar no tratamento paliativo de metástases à distância e ainda em casos envolvendo margens cirúrgicas comprometidas (MARCONATO et al., 2008).

Os antineoplásicos utilizados na medicina veterinária, de maneira geral, interferem na síntese de DNA, RNA ou na replicação celular, levando à parada da divisão ou à morte celular (SOUZA et al., 2008). Por esse motivo, é importante programar o intervalo de tempo das variadas sessões do tratamento (RODASKI;DE NARDI, 2008). Entretanto, estes efeitos não se aplicam apenas às células neoplásicas. A maioria dos antineoplásicos atua também sobre as células normais, especialmente aquelas que se dividem constantemente (elevado *turn-over*), como as células da medula óssea, epitélio das vilosidades intestinais e epitélio dos folículos pilosos, causando efeitos colaterais como mielosupressão, gastroenterite e alopecia, respectivamente (RODASKI;DE NARDI, 2008; SOUZA et al., 2008).

A Doxorrubicina é um antibiótico antitumoral, pertencente ao grupo das antraciclinas, derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, variedade *caesius*. É o antibiótico mais utilizado na terapia oncológica. Tem ação como agente citostático de forma a impedir a síntese do DNA e RNA pela inibição da transcriptase reversa da RNA polimerase, sendo um agente “ciclo celular” não específico. Protocolos quimioterápicos a incluem de forma isolada ou associada, sendo indicada nos tratamentos de leucemias agudas, carcinomas,

sarcomas, linfomas e outros tumores sólidos (DuVERNAY apud RANGEL et al., 2009; RODASKI;DE NARDI, 2008).

Em medicina, como tratamento adjuvante, é utilizada rotineiramente após o tratamento cirúrgico de pacientes com câncer de mama localizado, com o objetivo de erradicar possíveis micrometástases e reduzir a chance de recidiva tumoral, na tentativa de se aumentar o tempo de sobrevida das pacientes (GROSSMANN, 2007). Para aquelas com câncer de mama localmente avançado, recomenda-se a quimioterapia neoadjuvante, ou seja, antes da cirurgia definitiva, na tentativa de promover citorredução tumoral e aumentar a possibilidade da realização de uma cirurgia conservadora (MAURIAC et al., 1991).

A resposta de tumores de mama a agentes quimioterápicos citotóxicos em mulheres, como a doxorrubicina, varia significativamente em diferentes casos, onde uma pior resposta pode envolver mecanismos moleculares de resistência ao tratamento (TURTON et al., 2001). A resistência à fármacos pode ser intrínseca, decorrente de alterações genéticas ocorridas durante a progressão tumoral e alternativamente, extrínseca, pela ação do agente ao induzir genes que permitem a sobrevivência ou seleção de clones resistentes (KUDOH et al., 2000).

Em medicina veterinária, tem sido descrita as mono e poliquimioterapias. Nos cães, poucos são os relatos deste fármaco no tumor de mama, sendo indicada também em tumores mamários de gatas (RODASKI;DE NARDI, 2008). Simon et al. (2006) compararam três grupos de tratamento de cadelas com carcinoma mamário invasivo, sendo um grupo apenas de mastectomias e outros dois grupos com associação de antineoplásicos (doxorrubicina e docetaxel). Apesar dos grupos que receberam a quimioterapia apresentarem melhores resultados em relação à sobrevida e recidiva da doença, não houve diferença estatística entre os mesmos (metástases à distância, sobrevida e recidiva).

Todorova et al. (2005) avaliaram o seu emprego em associação a ciclofosfamida no tratamento adjuvante de 6 cadelas mastectomizadas.

Embora tenham ocorrido efeitos colaterais, os autores concluíram que a terapia foi satisfatória em relação à metástase e recidiva da doença. No entanto, o seu uso associado à ciclofosfamida, com e sem fluorouracila no tratamento do carcinoma mamário inflamatório, proporcionou pior resposta em relação ao uso do antiinflamatório não-esteroidal (piroxicam), principalmente quanto aos efeitos colaterais (SOUZA et al., 2009). Sua contra-indicação está associada a esses efeitos que podem desencadear, ainda, alterações hematológicas, gastrintestinais, cardiocirculatórias, dermatológicas, renais, entre outras. A cardiotoxicidade com a ocorrência de cardiomiopatia congestiva é a principal alteração observada, e que leva à exclusão do seu uso em alguns pacientes (RODASKI;DE NARDI, 2008).

Desde que haja um acompanhamento e suporte clínico adequados, durante o período de quimioterapia, os benefícios deste fármaco antineoplásico ainda superam os efeitos colaterais que a doxorrubicina poderá desencadear (RODASKI;DE NARDI, 2008).

2.2 Marcadores moleculares como fatores prognósticos

Os marcadores moleculares vêm sendo utilizados como subsídio para determinar o prognóstico e possível tratamento em vários tipos de tumores no homem e em animais. Dessa forma, painéis imuno-histoquímicos de biopsias mamárias ajudariam na caracterização de tumores e definição de um tratamento mais adequado, a fim de se obter uma melhor resposta frente a recidivas e aumento no tempo de sobrevida (LIMA, 2011; MARINHO et al., 2008).

Os marcadores biológicos como a proteína p53 e HER-2 são descritos como fatores preditivos e/ou prognósticos, com uso na rotina pós-cirúrgica de mulheres com câncer de mama (CROSIER et al., 1999; ZUCCARI et al., 2008).

2.2.1 Proteína p53

O gene supressor de tumor *TP53* (*Tumor Protein*) codifica uma proteína p53 denominada “guardião do genoma” cuja ativação ocorre em resposta ao

estresse e a agentes que danificam o DNA celular, ocasionando a interrupção do ciclo celular, induzindo à senescência ou apoptose (VOUSDEN;LANE, 2007; PIETSCH et al., 2008).

Quando as células sofrem estresse, a p53 se acumula no núcleo para induzir os eventos como apoptose e parada do ciclo celular (ZHANG;XIONG, 2001). Mas, apesar da principal localização no núcleo celular, a p53 também pode ter alguma função de transcrição no citoplasma e, raramente, será encontrada nas membranas celulares (ERSTER et al., 2004). Em uma célula normal, a p53 é mantida em baixas concentrações e possui uma meia-vida relativamente curta, não sendo identificada nas reações imuno-histoquímicas. Ao contrário da sua proteína mutante que apresenta uma meia-vida mais longa, acumulando-se na célula e sendo detectável pelo método em questão (DONE et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2011).

A inatividade da p53 no câncer é representada, portanto, pela expressão da p53 mutante. Consequentemente, um ambiente favorável à sobrevivência e proliferação de células anormais ocorre pela perda da função da p53 em reparar o DNA lesado (KIM et al., 2009; LACROIX et al., 2006).

A expressão de p53 em carcinomas mamários está associada com a agressividade tumoral, malignidade, resistência à quimioterapia e recidiva (KUMARAGURUPARAN et al., 2006; LACROIX et al., 2006; SCHMITT et al., 1998). De Nardi (2007) analisou 60 amostras de tumores mamários em cadelas por imuno-histoquímica e identificou baixa expressão da p53 nos adenomas e marcação acentuada nos carcinomas com pior prognóstico nas metástases e nos carcinomas inflamatórios, associando a mutação da p53 com a malignidade das neoplasias mamárias e com a expressão da COX-2.

Malamou-Mitsi et al. (2006) evidenciaram, ainda, significativo prognóstico negativo da p53 para o tempo de sobrevida em mulheres portadoras de câncer de mama submetidas ao tratamento quimioterápico adjuvante, apesar de não considerarem a p53 e o Bcl-2 como fatores preditivos para a quimioterapia. Teixeira et al. (2011) analisaram amostras mamárias de cadelas pelo método da imuno-histoquímica e verificaram que a proteína foi

expressa nas amostras malignas e em 33% das mamas normais contralaterais. Porém, os autores observaram ausência de marcação nas mamas dos animais do grupo controle (sem tumores de mama). Dessa forma, concluíram que quando a proteína não mutante está presente, não há marcação, indicando que há uma atividade normal desta proteína. Além disso, a expressão em mamas sadias da cadeia contralateral ao tumor maligno seria um indicativo da possibilidade de desenvolvimento de tumores futuros nestes locais, sendo alterações moleculares precursoras da carcinogênese que precedem as alterações histológicas. Estes mesmos autores não conseguiram, porém, correlacionar a expressão de p53 com a graduação histológica.

Lee et al. (2004) analisaram amostras de 20 cadelas com tumores mamários e encontraram a expressão da p53 em 20% dos benignos e 30% dos malignos. Consideraram, ainda, constituir-se um evento independente de mau prognóstico e baixa sobrevida. Rungsipipat et al. (1999), avaliaram 79 tumores mamários, sendo 16% considerados benignos e 30,6%, malignos e descreveram a expressão da proteína, sugerindo que, nos estágios iniciais do câncer, ocorrem alterações no gene p53. Em um animal, os autores em questão encontraram a expressão simultânea do HER-2 e p53.

2.2.2 Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2)

A família do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (EGFR) inclui quatro membros: EGFR (ErbB1), HER-2 (neu/ErbB2), HER-3 (ErbB3) e HER-4 (ErbB4), que são proteínas tirosina-quinase, localizadas nas membranas celulares e estão relacionados com a progressão tumoral e prognóstico de vida em vários tipos de câncer (ULLRICH;SCHLESSINGER, 1990; YARDEN, 2001). Sua ligação com receptores específicos leva à formação de homo e heterodímeros que estimulam diversas cascatas enzimáticas, que controlam a proliferação e a sobrevivência das células (KING et al., 1988; SCHLESSINGER, 2000; HERBST, 2004; NORMANNO et al., 2006).

Alterações no protooncogene HER-2, localizado no cromossomo 17q, frequentemente contribuem para a tumorigênese no câncer de mama humano. Em mulheres, a superexpressão da proteína HER-2 pode estar presente em 25 a 30% dos casos e está associada a mau prognóstico e tempo de sobrevida mais curto (SLAMON et al., 1987; SLAMON et al., 1989; ROSS et al., 2003). A amplificação do HER-2 no câncer invasivo de mama é considerada um fator preditivo significativo de recidiva e tempo de sobrevida, além de se comportar de maneira independente aos demais fatores prognósticos (comprometimento linfático, tamanho do tumor, receptores hormonais) (SLAMON, et al., 1987; SLAMON et al., 1989).

Em relação à imunomarcagem do HER-2, os dados publicados são contraditórios. Hsu et al. (2009) avaliaram 91 cadelas com tumores mamários malignos, nos quais houve a expressão do HER-2 em 29,7% deles. Nos tumores benignos e tecidos normais, não houve positividade da reação. Um ano após o procedimento cirúrgico, evidenciou-se que aqueles com positividade à marcação, estavam entre aqueles com os maiores índices de longevidade. Tal resultado contraria os dados encontrados por outros autores, que correlacionam o HER-2 aos maiores índices de morte em cadelas (DE LAS MULAS et al., 2003) e, com as menores taxas em mulheres (DUTRA et al., 2004).

Ressel et al. (2013) identificaram aumento na expressão do HER-2 em 27,3% dos adenomas e 28,6% dos carcinomas mamários de cadelas pelo método da imuno-histoquímica e ressaltaram, ainda, o aumento da proteína nos tecidos normais e hiperplásicos/displásicos localizados nas adjacências dos carcinomas das cadelas avaliadas. Rungsipipat et al. (1999) identificaram imunomarcagem positiva em 2,5% dos tumores misto benignos, 7,6% dos adenomas simples e 2,5% dos adenomas complexos.

Bertagnolli et al. (2011) encontraram aumento na expressão em 8,3% dos tumores mistos benignos, e em 10% dos casos de carcinoma em tumor misto benigno. De Las Mulas et al. (2003), encontraram positividade em 17,6% dos carcinomas mamários de cadelas e reação negativa em todas as suas

amostras de benignos; associando a superexpressão com os piores prognósticos; dados também observados na medicina humana (SLAMON et al., 1987).

2.3 Cultivo celular de tumores mamários de cadelas

O cultivo celular tem sido utilizado como modelo in vitro nas pesquisas relacionadas com o câncer, tanto no estudo do comportamento biológico pelas interações moleculares, quanto nos testes medicamentosos (BURDALL et al., 2003; PAWLOWSKI et al., 2009). No entanto, há várias diferenças celulares e moleculares relacionadas ao meio celular do cultivo in vitro quando comparadas aos tecidos in vivo, pois esses últimos estão rodeados por demais estruturas teciduais extra-celulares heterogêneas (PAWLOWSKI et al., 2009). O sistema in vitro possibilita a direta avaliação sobre a população celular desejada, já que exclui todas as interações entre demais órgãos e sistemas linfático e circulatório (SULTAN; HAAGSMAN, 2001).

Em geral, o cultivo celular apresenta duas vantagens: 1) controle do meio físico-químico (variáveis pH, temperatura, oxigênio, gás carbônico) e 2) das condições fisiológicas (concentração de hormônios e nutrientes). Originalmente, as amostras teciduais possuem caráter heterogêneo, originando culturas com variados tipos celulares que, após uma ou duas passagens, começam a assumir um comportamento mais homogêneo com o predomínio do tipo celular daquelas que mais se adaptaram ao novo ambiente sob um sistema controlado laboratorialmente (FRESHNEY, 2010).

Quanto à forma de cultivo, há três tipos: **órgão** (em que ocorre a manutenção da estrutura original do tumor, com a formação de nódulos, sendo o cultivo tridimensional um exemplo), **explante primário** (em que há a migração celular a partir de um fragmento tecidual sobre uma superfície de vidro ou plástica) e **celular** (suspensão celular obtida do explante por desagregação mecânica e/ou enzimática e obtenção de crescimento celular em monocamada) (FRESHNEY, 2010). Algumas limitações, no entanto, interferem

diretamente nessa metodologia, como elevados custos com materiais e reagentes, risco de contaminação externa e cruzada, e perda das interações celulares (FRESHNEY, 2010).

Na medicina veterinária, existem poucos experimentos utilizando culturas de tumores mamários de cadela. Os testes quimioterápicos *in vitro* também correspondem a resultados pouco difundidos. Simon et al. (2001) determinaram a concentração inibitória (IC-50) em culturas celulares de tumores mamários de cadelas utilizando-se os quimioterápicos doxorrubicina, carboplatina e cisplatina. A eficácia da doxorrubicina foi maior do que os derivados da platina. Sobral et al. (2008) utilizaram fragmentos teciduais originários de carcinomas mamários de cadelas para testar *in vitro* a eficácia da doxorrubicina na concentração de 1µM por um período de 24 horas, concluindo que esse modelo experimental pode ser uma alternativa para testes *in vitro* com antineoplásicos.

A utilização de cultura celular derivada de tumores primários tem importância fundamentada, principalmente nos testes terapêuticos com fármacos, em busca de novas doses e teste de novos medicamentos, descartando o uso inicial de animais de laboratório. Dessa forma, mesmo diferindo do tecido original, ainda é uma ótima opção pela fácil aquisição, em relação aos tumores *in vivo* que constituem-se um entrave se a casuística do local for baixa. Cada tipo de tumor deve, preferencialmente, ter sua respectiva cultura celular para ter sua aplicabilidade justificada. As culturas em monocamadas possuem mais sensibilidade aos testes quimioterápicos do que os tumores *in vivo* (SIMON et al., 2001; PAWLOWSKI, et al., 2009). Dessa forma, o cultivo 3D têm um propósito mais direcionado para esses tipos de estudos, mas necessitam obrigatoriamente do estabelecimento de linhagens celulares em monocamadas.

As diferenças relacionadas ao meio celular entre o tecido original e o cultivo celular incluem a heterogeneidade tecidual *in vivo* e a expressão gênica que pode se alterar e interferir na proliferação e no metabolismo celulares (PAWLOWSKI et al., 2009). Embora ocorram essas alterações, o cultivo celular

ainda é uma importante ferramenta para o estudo do câncer de mama (BURDALL et al., 2002).

A caracterização das células do cultivo celular é indicada para se confirmar a origem da população celular a que se pretende avaliar. O uso da vimentina tem por objetivo identificar as células de origem mesenquimal (inclusive os fibroblastos e as células mioepiteliais) e a citoqueratina, as de origem epitelial. A contaminação das culturas por fibroblastos, que podem desqualificá-la, deve ser descartada utilizando-se um marcador específico como o da proteína p63 (BOTELHO, 2009; GAMA, 2009). Por ser um membro da família p53, justifica-se a sua expressão nuclear nas células mioepiteliais, localizadas ao redor dos ductos e lóbulos da glândula mamária (REIS-FILHO;SCHMITT, 2002; STEFANOU *et al.*, 2004).

III OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Padronizar o cultivo de tumor mamário de cadelas, proveniente de fragmentos dos tumores primários;
- Avaliar a expressão de marcadores por imuno-histoquímica no tumor original e, de imunofluorescência, no respectivo cultivo celular;
- Realizar testes *in vitro* com o quimioterápico doxorrubicina em diferentes concentrações e, avaliar a sua eficácia em promover a morte de células mamárias entre os diferentes grupos histológicos;

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o cultivo células tumorais provenientes de fragmentos de tumores mamários de cadelas obtidos em procedimento de mastectomias eletivas;
- Comparar a distribuição dos imunomarcadores: citoqueratina, vimentina, p53 e HER-2, expressos no tumor original, pela imuno-histoquímica e no respectivo cultivo, pela imunofluorescência;
- Avaliar a viabilidade das células tumorais mamárias *in vitro* frente às concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 2 μM de doxorrubicina pelo método de exclusão com o azul de tripan e de acordo com o grupo histológico avaliado;
- Analisar o comportamento celular frente à exposição com a doxorrubicina de forma individualizada.

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 A).

4.1 Seleção dos animais

Uma prévia seleção dos pacientes foi realizada junto ao Hospital Veterinário “Luíz Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Cadelas com tumores mamários foram, inicialmente, atendidas junto ao serviço de Oncologia. A triagem constou de exame físico geral e específico da(s) mama(s) acometidas, exames laboratoriais (hemograma, bioquímica sérica e sorologia para leishmaniose), eletrocardiografia, punção biopsia aspirativa por agulha fina e radiografias torácicas, além do estadiamento clínico pelo sistema TNM.

Todos os animais considerados aptos clinicamente para serem anestesiados foram submetidos ao tratamento cirúrgico de mastectomia, com o prévio consentimento de seus proprietários. Como critério de inclusão, somente as cadelas não submetidas a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico anterior foram selecionadas para o estudo e as áreas de colheita não abrangeram aquelas que apresentaram ulcerações.

4.2 Obtenção das amostras

As amostras de cada paciente foram colhidas ao término do procedimento cirúrgico de mastectomia em condições assépticas e ambiente cirúrgico. A escolha pela mastectomia unilateral ou radical foi determinada de acordo com o planejamento de cada cirurgião que milita no Serviço.

Após a excisão do tumor, um fragmento foi removido imediatamente e dividido em dois fragmentos. O primeiro foi acondicionado em frasco plástico contendo solução de formol tamponado a 10% e encaminhado ao setor de

Patologia Animal, para o diagnóstico anatomopatológico. O segundo fragmento destinou-se ao cultivo celular com acondicionamento em tubo¹ estéreis cônicos de 50 mL, contendo meio *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) 1640², acrescido de 5% de suspensão de antibiótico e antimicótico³ e, ainda, de solução de glutamina 5%⁴. Ato contínuo, a amostra foi imediatamente transportada, em ambiente refrigerado, para o Laboratório de Virologia Veterinária e Cultivo Celular (UNESP-Araçatuba), onde os ensaios *in vitro* se iniciaram (FIGURA 1.I).

4.3 Cultivo celular

Todas as amostras enviadas ao laboratório foram processadas de forma padronizada com o intuito de estabelecer um protocolo laboratorial de cultivo celular para esse tipo de amostra (tumor de mama). A manipulação dos fragmentos tumorais foi conduzida em capela de fluxo laminar em condições assépticas, com o intuito profilático de se evitar a contaminação bacteriana.

Inicialmente, foi realizada a fragmentação mecânica do tecido em placa de vidro com auxílio de bisturi e pinça estéreis. Sequencialmente, a digestão enzimática para a individualização celular foi realizada, com a adição de meio de cultivo RPMI 1640 (10 mL) adicionado de colagenase⁵ a 0,5% (50µL) em tubos cônicos estéreis de 50 mL, mantidos em estufa de banho-maria a 37°C por no mínimo duas horas. Após esse período, uma centrifugação do material sob $2,465 \times g$ ⁶ foi realizada, em centrífuga refrigerada⁷, durante cinco minutos.

¹ Becton Dickinson, BD Falcon®, Franklin Lakes, NJ, USA, código 352099

² Advanced RPMI 1640, Invitrogen®, Grand Island, NJ, USA, código 12633

³ Suspensão de antibiótico e antimicótico estabilizada 100x, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA, código 15240

⁴ L-Glutamina 200 MM, GlutaMAX™ Supplement, Sigma-Aldrich®, código 35050

⁵ Sigma-Aldrich®, código C2139

⁶ xg =força gravitacional

⁷ Centrífuga EPPENDORF® 5810R

Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado, e ao material restante no fundo do tubo, adicionou-se 10 mL de meio RPMI, seguido por nova centrifugação. Mais uma vez o sobrenadante foi removido e, em seguida, procedeu-se a lavagem com 0,5 mL de solução de tripsina⁸ durante 5 minutos, com posterior centrifugação e desprezo do sobrenadante (FIGURA 1.II). Em todas as etapas, o sobrenadante foi desprezado na taxa de cerca de 90% da solução total.

Os fragmentos (explantes), juntamente com o *pellet* resultante, foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (5,0 mL), acrescido de solução de antibiótico e antimicótico e glutamina, além de soro fetal bovino (SFB)⁹ 10%, e imediata transferência para uma garrafa de cultura ventilada¹⁰ de 25 cm² e tampa de rosca com filtro, que fora mantido em estufa de cultura a 38°C e 5% CO₂. Todas as garrafas foram identificadas com o número da cultura, número da passagem e data (FIGURA 2).

Após três horas iniciais do cultivo, tempo em que normalmente se dá o início da adesão celular ao plástico, o meio de cultura foi renovado permanecendo, assim, por aproximadamente 24 horas. Ao final deste tempo, explantes foram removidos da garrafa por filtragem, com filtro comercial apropriado¹¹. Ato contínuo, a suspensão celular foi centrifugada e o *pellet* ressuspendido no meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)¹², acrescido de solução de antibiótico e antimicótico, glutamina e SFB 10%. Após 24 horas, houve nova troca deste mesmo meio, que permaneceu até que se observasse mudança em sua coloração (originalmente rósea para um tom mais alaranjado ou amarelado), ou a cada cinco dias.

⁸ 0,25% Trypsin-EDTA solution 1x, Phenol Red, Invitrogen®, código 25200

⁹ SFB, Invitrogen®, código 12657

¹⁰ BD Falcon®, código 353109

¹¹ Cell strainer 70µm, white, BD Falcon®, código 352350

¹² Advanced DMEM 1x, Invitrogen®, código 12491

Diariamente, as garrafas foram analisadas por microscopia invertida até a formação de tapete único e contínuo (confluência) para, então, serem tripsinizadas e cultivadas em novas garrafas (passagem). A tripsinização ocorreu pela retirada do meio de cultivo da garrafa com o auxílio de pipeta e adição de tripsina. Inicialmente, 1,0 mL de tripsina foi necessário para lavar o tapete celular e retirar o SFB restante, já que o mesmo tem a propriedade de inativar a ação deste produto. Esta solução foi mantida na garrafa até que se observasse o descolamento do tapete celular formado ou, no máximo, por cinco minutos. Em seguida, desprezou-se esta solução e adicionou-se mais 1 mL de tripsina pelo mesmo tempo (FIGURA 3).

Para inativar a ação da tripsina, foi adicionado SFB e distribuído para outras duas garrafas de 25 cm² ou de 75 cm², com adição de DMEM. Ao final da quarta e vigésima passagens (quando possível), as células foram transferidas para placas de cultura própria¹³ com seis poços, destinando-se os ensaios quimioterápicos, e em lâminas de cultura própria¹⁴ com quatro compartimentos para ensaios quimioterápicos e de imunomarcação. Alíquotas das culturas foram congeladas em SFB acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO₄) 10%, e acondicionadas em freezer a -80°C e nitrogênio líquido.

¹³ BD Falcon®, código 353046

¹⁴ BD Biosciences®, Bedford, MA, USA, código 354114

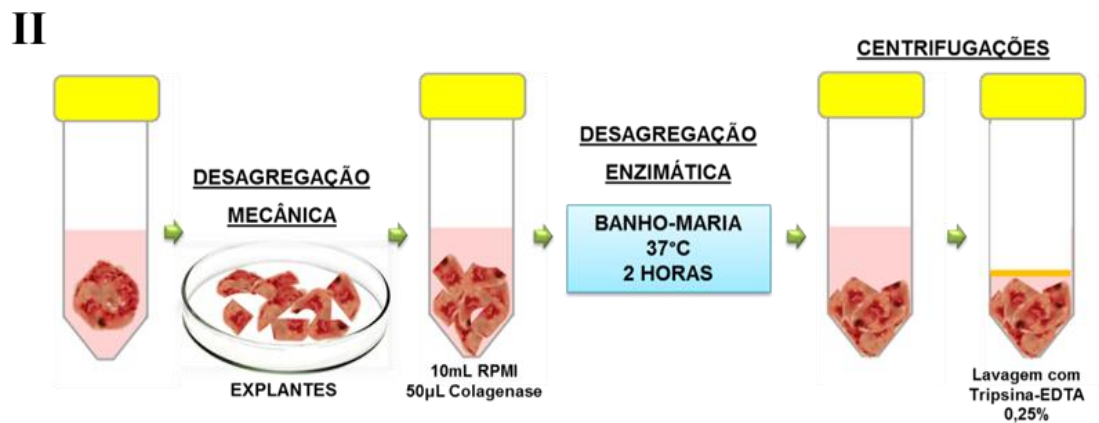
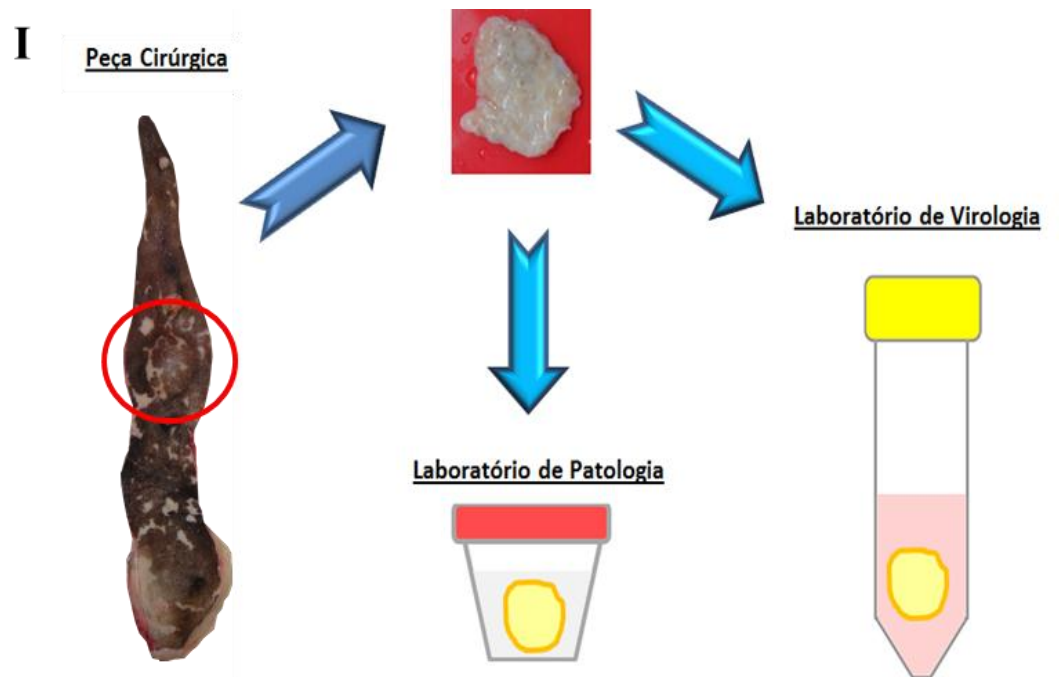


FIGURA 1 – I) Fluxograma da colheita e destino das amostras de tumores mamários de cadelas. II) Esquematização do processo de desagregação mecânica e química dos fragmentos de tumor mamário, seguido por lavagem com tripsina para obtenção de suspensão celular e dos explantes.

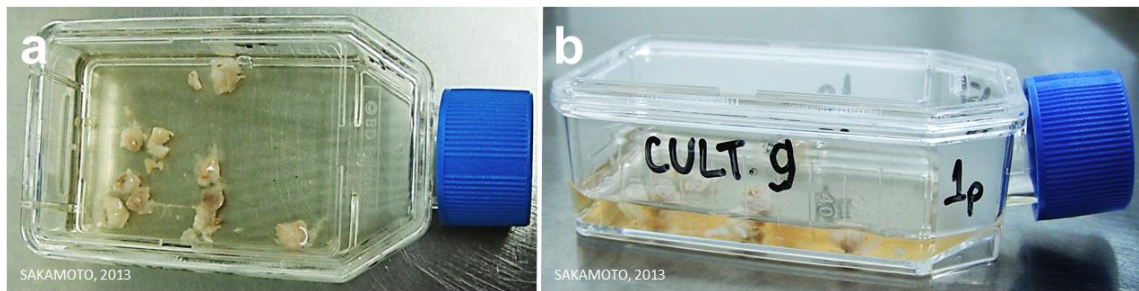


FIGURA 2 – Garrafa de cultura de 25 cm². a) Meio de cultivo, suspensão celular e explantes. b) Identificação da amostra e do número da passagem realizada.

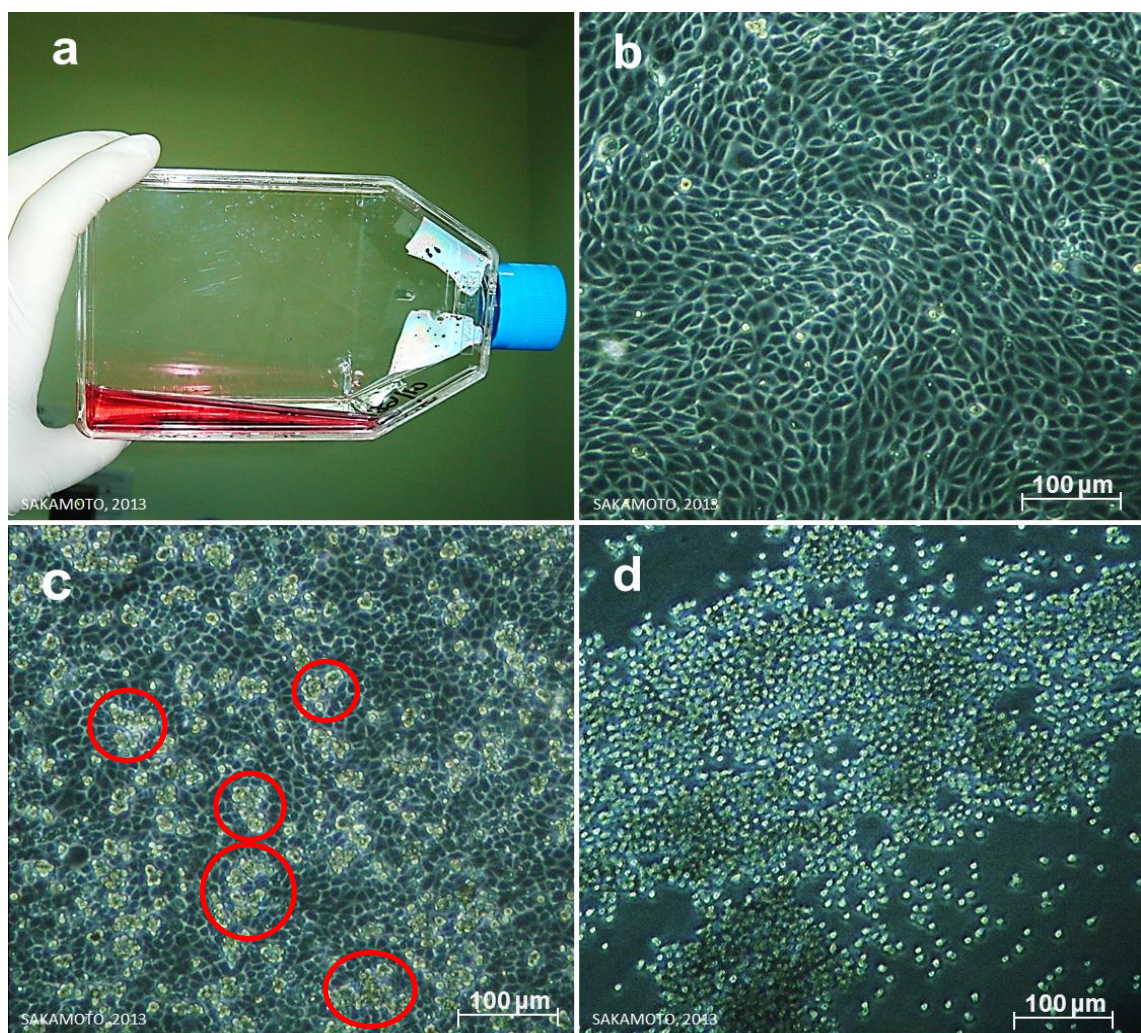


FIGURA 3 – Processo de tripsinização. a) Garrafa de cultivo com presença de tapete celular visível (névoa no fundo da garrafa). b) Confluência total do tapete celular. c) Início da ação da tripsina 0,25% com presença de aglomerados celulares que se destacaram (aros). d) Total descolamento do tapete celular. Células encontram-se aglomeradas e soltas junto ao meio. Visualização sob microscopia invertida (40x).

4.4 Avaliação imuno-histoquímica e de imunofluorescência

As células foram cultivadas em lâminas de cultivo, em estufa à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂, protegidas de luz, em quadruplicatas para cada cultivo (FIGURA 6A). Duas foram destinadas à imunofluorescência e também como o grupo controle daquelas (outras duas restantes) submetidas ao tratamento com doxorrubicina, na concentração de 0,25 µM. O cultivo foi realizado até a confluência das células, momento em que se procedeu a fixação das lâminas utilizando-se solução de metanol e acetona (3:2) em placa de gelo. Após a fixação, as lâminas foram congeladas em temperatura a -20°C até a realização da imunofluorescência ou do tratamento.

O método imuno-histoquímico empregado nos fragmentos histológicos parafinizados do tumor primário foi o da estreptoavidina-biotina-peroxidase. A revelação utilizou o cromógeno diaminobenzidina¹⁵ e a contra-coloração com hematoxilina de Harris.

Para a imunofluorescência, utilizaram-se as lâminas de cultivo com as células já fixadas e congeladas. Incubou-se com anticorpo primário seguido pelo anticorpo secundário FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) (anti-coelho e anti-camundongo¹⁶ IgG) e contra-coloração com DAPI¹⁷.

Para o grupo controle, o PBS (Solução Tamponada de Fosfato) foi usado para substituir o anticorpo primário específico em cada etapa. As imagens foram visualizadas com microscópio invertida¹⁸ e as imagens foram capturadas com câmera 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 respectivas diluições estão apresentados conforme Tabela 2.

¹⁵ DAB – SIGMAFAST™ 3,3'- diaminobenzidine tablets, Sigma-Aldrich®, código D4168

¹⁶ Anticorpo secundário IgG, Sigma-Aldrich®, código F6005 e F2653

¹⁷ 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich®, código D9542

¹⁸ Microscópio IX 70, Olympus®, Tokyo, Japão

Tabela 2 – Relação dos anticorpos primários, fabricantes e diluições utilizados

ANTICORPO	TIPO - CLONE	FABRICANTE	DILUIÇÃO
Anti-Citoqueratina	Monoclonal (rato) - PCK-26 (C1801)	Sigma-Aldrich®	1:150
Anti-Vimentina	Monoclonal (rato)- V9 (V6630)	Sigma-Aldrich®	1:100
Anti-p53	Policlonal (coelho) – C-Terminal (SAB4503000)	Sigma-Aldrich®	1:100
Anti-HER-2	Policlonal (coelho) – c-erbB-2 (A0485)	DAKO®	1:350
Anti-p63	Monoclonal (rato) – 4A4 (P3737)	Sigma-Aldrich®	1:200

A marcação com o anticorpo HER-2 foi seguindo os critérios adotados pela *American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists* (ASCO/CAP) (WOLFF et al., 2007), com a seguinte classificação: negativo (ausência de marcação), 1+ (marcação fraca e incompleta da membrana, quaisquer números de células), 2+ (completa marcação circunferencial da membrana, de forma heterogênea ou fraca, em pelo menos 10% das células), 3+ (marcação uniforme e homogênea da membrana celular em pelo menos 30% das células) .

Para os demais anticorpos, padronizou-se a seguinte classificação: 0 (ausente), 1+ (leve), 2+ (moderado) e 3+ (intenso) para a intensidade de marcação e 0 (ausente), 1+ (<10% de marcação celular), 2+ (10 a 30%) e 3+ (30 a 70%) e 4+ (>70%) para a frequência de expressão. Para efeito comparativo da intensidade de marcação nos tumores e cultivos, o critério de intensidade também foi adotado para o anticorpo HER-2.

O uso do p63 objetivou verificar uma possível contaminação com fibroblastos na cultura celular estabelecida, já que este anticorpo marca as células mioepiteliais. Portanto, foi empregado no tecido e no cultivo.

4.5 Ensaios quimioterápicos

Os ensaios terapêuticos foram conduzidos em cultivo das células mamárias em placas de seis poços, utilizando-se uma garrafa de 75 cm², contendo aproximadamente 12×10^6 células sob confluência total, submetida à tripsinização e adição de DMEM e SFB 10% suficientes para preencher cada poço com 1mL de meio celular, totalizando, portanto, 12 poços com aproximadamente 10^6 células por poço, já que os ensaios experimentais foram realizados em duplicatas. Após a confluência celular, observada diariamente por microscópio de luz invertida, o antineoplásico doxorrubicina¹⁹ foi adicionado às culturas de células a serem tratadas. E, para tanto, constituíram-se dois grupos de estudo: 1) **controle** (DMEM+SFB) e 2) **tratados** (quimioterápico/DMEM+SFB) em diferentes concentrações (0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 2,0µM) (FIGURA 4), segundo descreveram Simon et al. (2001) e Sobral (2006).

Para se obter a concentração final desejada em cada poço e, ainda, permitir que as células tivessem um meio propício ao seu desenvolvimento, foi necessário adicionar meio de cultivo (DMEM+SFB 10%) em todos os ensaios, de forma igualitária. Dessa maneira, após a confluência, o meio foi renovado por outro, mas no volume total de 0,5mL para todos os grupos. No grupo controle foi adicionado somente 0,5mL de DMEM e aos grupos tratados, adicionou-se 0,5mL de doxorrubicina em diferentes diluições com solução estéril de água para injeção. Salienta-se que a manipulação do quimioterápico foi seguindo os padrões de biossegurança necessários (óculos de proteção, jaleco, luvas duplas, máscara facial com filtro e capela de fluxo laminar tipo II B2). O período de tratamento foi de 24 horas em estufa, à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ e protegido de luz. Ato contínuo, realizou-se o processo de tripsinização em cada poço, para a contagem celular.

¹⁹ Doxolem[®] 10mg pó frasco-ampola, Zodiac[®], Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil

4.5.1 Contagem do número de células pós-quimioterapia pelo azul de Tripán

Após o tratamento quimioterápico *in vitro* das células nas placas de cultivo, realizou-se a contagem celular de ambos os grupos pela técnica de contagem hemocitométrica de suspensão celular (Neubauer[®]) com o corante azul de Tripán 0,4%²⁰. Como o volume final de cada poço (células e tratamento) foi de 1,0 mL, o número de células encontrados refere-se a esse mesmo volume. A metodologia utilizada consistiu, primeiramente, em retirar o sobrenadante e aloca-lo em tubo do tipo Falcon de 15 mL para que as células em suspensão não fossem descartadas à contagem. Em seguida, efetuou-se a tripsinização até que o tapete celular se desprendesse por completo da placa.

Em alguns grupos, foi necessária a utilização de raspador celular (“rodo”) para auxiliar a remoção do tapete celular. A suspensão celular resultante foi transferida para o mesmo tubo de 15mL inicial e centrifugada a 1, 289 x g durante cinco minutos para obtenção de *pellet* celular (FIGURA 4).

O sobrenadante foi descartado em local apropriado para lixo contaminante por conter o quimioterápico e o *pellet* foi ressuspenso em 1,0 mL de solução de PBS. Para a contagem em câmara hemocitométrica, o volume constituído de 0,6 mL de azul de Tripán, além de 0,3 mL de PBS e 0,1 mL de suspensão celular foi homogeneizado em tubos cônicos de 1,5 mL, com posterior descanso de dez minutos. Em seguida, foram transferidos para a câmara. A leitura foi realizada por um observador às cegas e microscópio de luz invertida.

A contagem ocorreu na área do quadrado central e mais outros quatro periféricos, em ambos os lados da câmara, totalizando a contagem em 10 quadrados. As células viáveis foram diferenciadas como aquelas que não se coraram com o azul de Tripán, diferentemente das células inviáveis em que adquiriram coloração azulada (FIGURA 5).

²⁰ Azul de Tripán 0,4% para microscopia, Sigma-Aldrich[®], código 93595

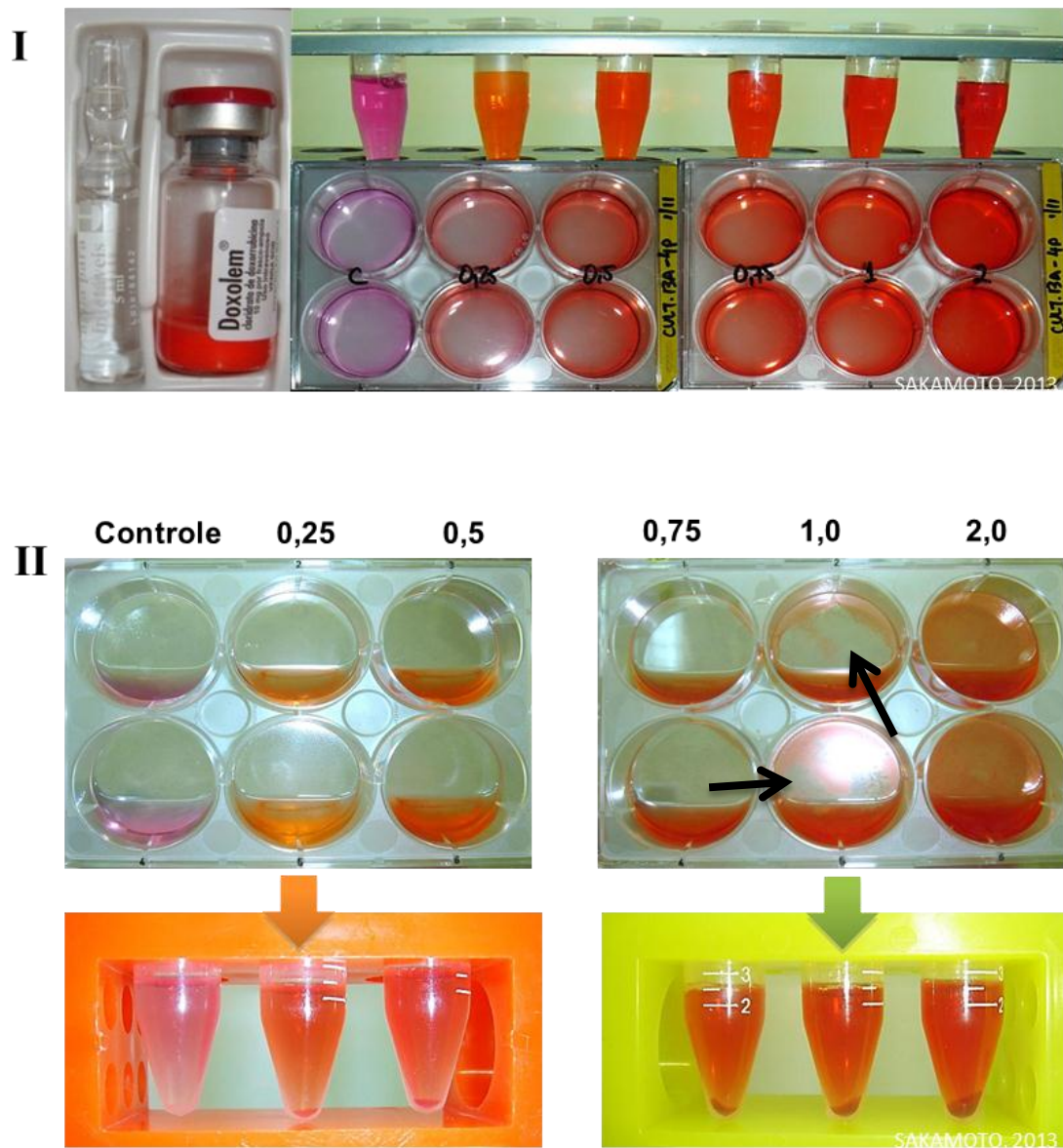


FIGURA 4 – Testes quimioterápicos com a doxorubicina em diferentes concentrações. I) Frasco-ampola comercial contendo o quimioterápico liofilizado e diluente (água para injeção) e diluições seriadas da doxorubicina: Controle (DMEM) - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 2,0 μ M de doxorubicina (esquerda para direita) já prontos para serem adicionados ao cultivo (acima) e placa de cultivo de 6 poços contendo as células e os tratamentos (abaixo). II) Placas de cultivo (acima) submetidas ao tratamento quimioterápico nas diferentes concentrações por 24 horas e presença de descolamento do tapete celular (setas negras). *Pellet* obtido após processo de centrifugação da suspensão e do tapete celulares das placas tratadas (abaixo).

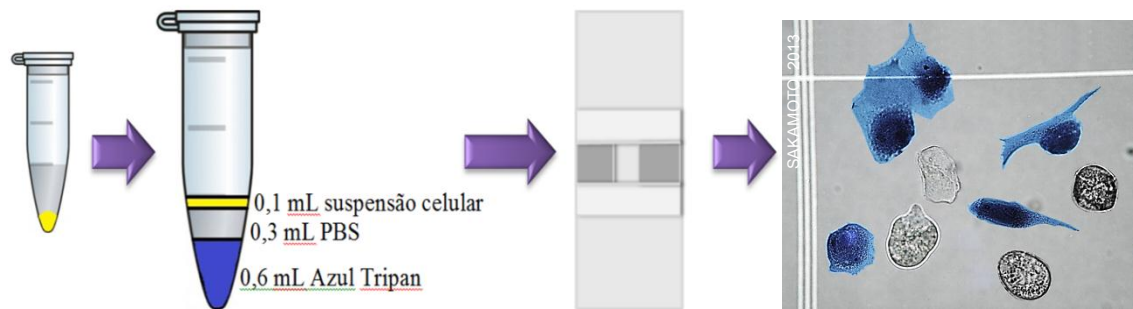


FIGURA 5 – Esquematização da determinação do número total de células viáveis através da técnica de contagem celular em câmara hemocitométrica de suspensões celulares coradas com Azul de Tripán.

4.5.2 Contagem e viabilidade celular

As fórmulas utilizadas para a obtenção da viabilidade celular estão dispostas abaixo.

Células/mL = Contagem média por quadrado $\times$ Fator de diluição $\times 10^5$ (= 10 quadrados)

Células Totais = Número de células/mL $\times$ Volume da suspensão original

Viabilidade Celular (%) =
$$\frac{\text{Total de células viáveis (não coradas)}}{\text{Total de células (coradas e não coradas)}} \times 100$$

4.6 Análise Estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar o número de passagens do cultivo em relação aos grupos histológicos.

Para as imunomarcações, com análise comparativa para a imunohistoquímica dos blocos parafinizados dos tumores originais e da imunofluorescência das culturas celulares (quinta passagem), utilizou-se o teste de Wilcoxon para avaliar a frequência e intensidade dos marcadores vimentina, citoqueratina, p53 e HER-2.

Para a avaliação entre a viabilidade celular de acordo com a concentração da doxorubicina (tratamento) e também com a subdivisão em grupos histológicos, foi utilizado o teste de Friedman e de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

O programa estatístico utilizado foi Instat GraphPad versão 3.10.

V RESULTADOS

Cultivos celulares

Em 22 cadelas foram colhidos 39 amostras tumorais. Dessas, provenientes de 13 cadelas, 44% (17/39) foram cultivadas com êxito até as passagens quinta até vigésima. Das amostras cultivadas, 70,6% (12/17) tratavam-se de tumores malignos. Quatro grupos histológicos puderam ser compostos: tumor misto benigno (TMB - cinco amostras), carcinoma complexo (CC - cinco amostras), carcinoma simples (CS - cinco amostras) e carcinoma espinocelular (CEC - duas amostras) (FIGURAS 6 e 7).

A morfologia celular não variou consideravelmente entre os grupos TMB, CC e CEC. Em geral, as células apresentaram formato fibroblastoide com células alongadas, grande quantidade de citoplasma e vários núcleos. O CS, por englobar três tipos de tumores, apresentou distinções entre as amostras. O carcinoma tubulopapilífero tinha como representante células de formato epitelióide com pouco citoplasma e alto grau de multiplicações e contato celulares. O carcinoma sólido, formato fibroblastoide, células estelares e citoplasma abundante. Já o carcinoma anaplásico apresentou células com formato fibroblastoide (discretamente alongadas) e epitelióide (FIGURA 8).

As células com formato epitelióide tinham a característica de crescerem de forma a se sobrepor umas às outras, formando várias camadas na garrafa de cultivo. As fibroblastoides, normalmente formavam colônias. Em geral, o TMB foi o que apresentou menor tempo de adaptação entre as passagens e o CC, o maior período. De acordo com o número de dias até a quarta passagem que cada cultura levava para atingir a confluência, houve um decréscimo em relação às passagens iniciais. Para atingir a segunda passagem, o número máximo de dias foi 30, mínimo de sete e média de 14 dias, que foram decrescendo conforme o avanço das transferências e a permanência de células que mais se adaptaram ao meio de cultivo, visualizado pela homogeneidade celular no tapete (FIGURA 9).

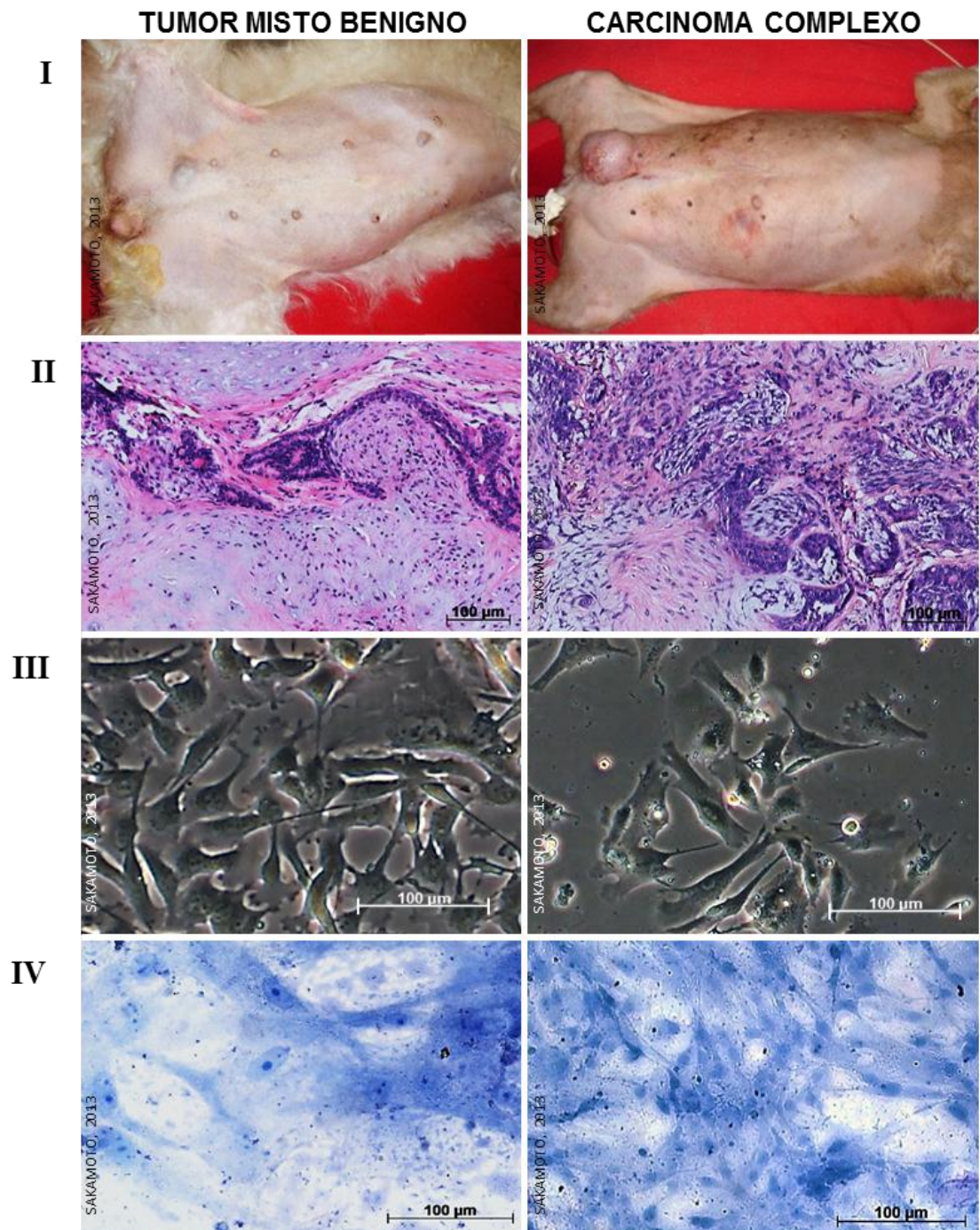


FIGURA 6 – Cadela com tumor misto benigno e carcinoma complexo. I) Ilustração macroscópica do tumor. II) Fotomicrografia da histopatologia (coloração de Hematoxilina e Eosina, microscopia de luz, aumento de 20x). III) Células tumorais mamárias na quinta passagem (microscopia invertida, aumento de 40x). IV) Células tumorais mamárias na quinta passagem (após fixação com metanol e acetona, congelamento a -20°C e coloração com Hematoxilina, microscopia invertida, aumento de 40x).

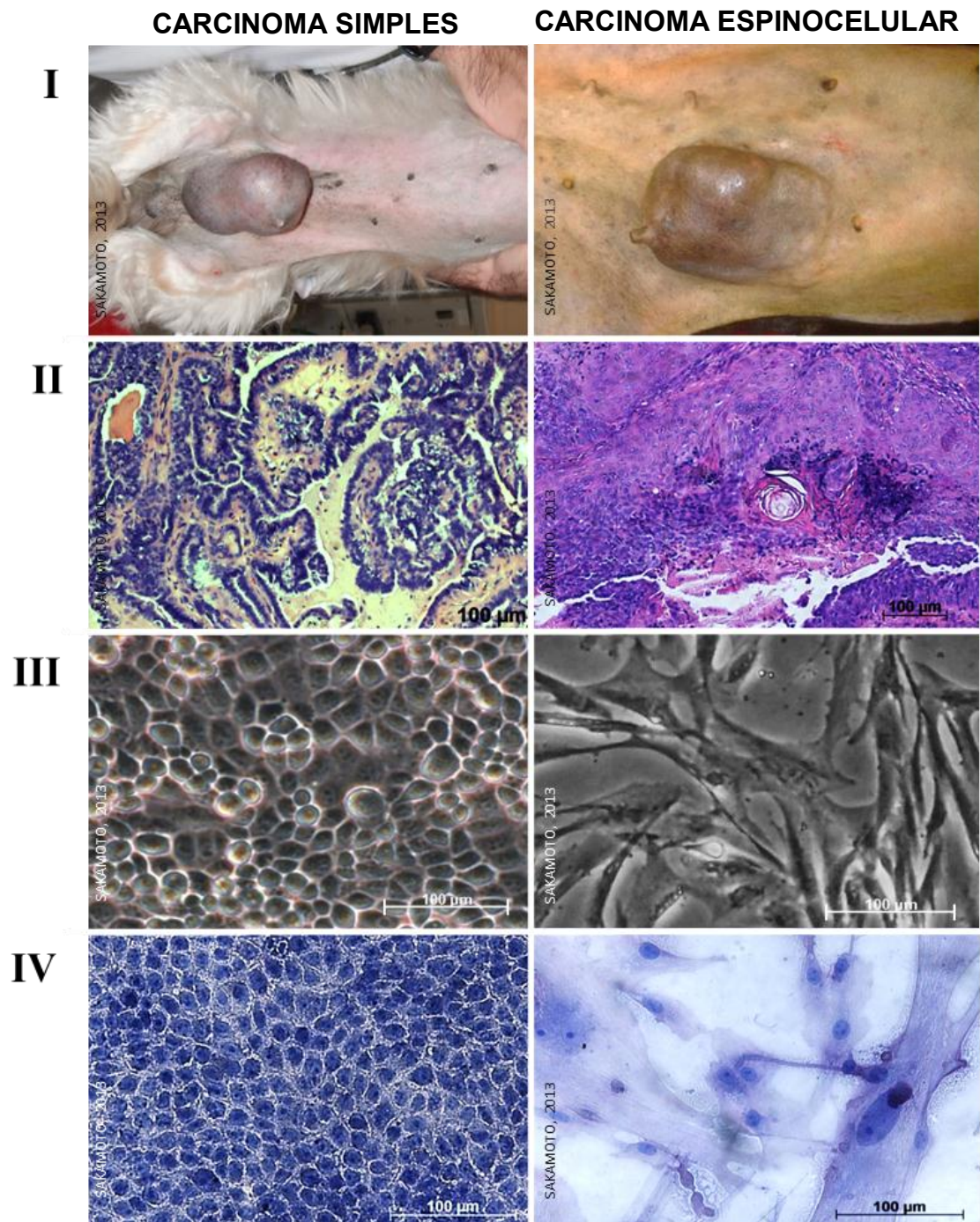


FIGURA 7 – Cadela com tumor mamário simples (carcinoma tubulopapilífero cístico) e carcinoma mamário de células espinhosas. I) Ilustração macroscópica do tumor. II) Fotomicrografia da histopatologia (coloração de Hematoxilina e Eosina, microscopia de luz, aumento de 20x). III) Células tumorais mamárias na quinta passagem (microscopia invertida, aumento de 40x). IV) Células tumorais mamárias na quinta passagem (após fixação com metanol e acetona, congelamento a -20°C e coloração com Hematoxilina, microscopia invertida, aumento de 40x).

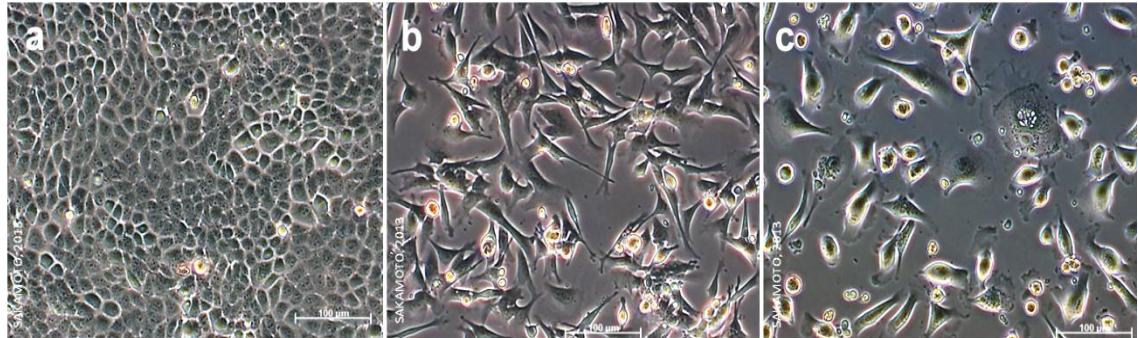


FIGURA 8 – Fotomicrografia em microscopia invertida (40x) de tumores mamários de cadelas na quinta passagem. A) Cultura celular de carcinoma Tubulopapilífero (epitelióide). B) Carcinoma sólido (fibroblastoide). C) Carcinoma anaplásico (misto).

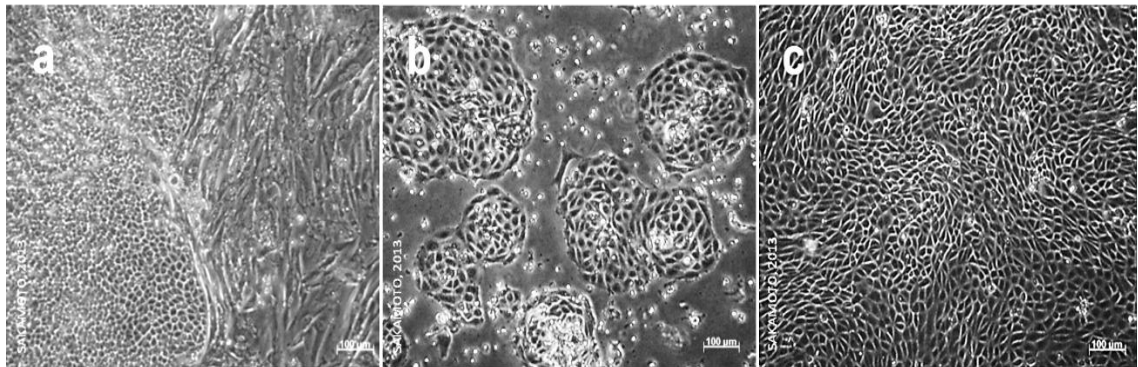


FIGURA 9 – Cultura de carcinoma mamário tubulopapilífero nas 1ª, 2ª e 3ª passagens (a,b,c). Observar a mudança no predomínio celular. A primeira passagem contém variados tipos celulares, demonstrando um caráter heterogêneo proveniente dos explantes, o que levou ao aumento do número de dias para atingir a confluência total. Na 3ª passagem, a cultura já se apresentava com uniformidade celular do tipo epitelióide (100% de confluência) .

Todas as amostras, exceto duas do CS que representavam o carcinoma tubulopapilífero cístico, iniciaram o processo de senescência a partir da quinta passagem (FIGURA 10) e apresentavam morfologia celular do tipo fibroblastoide. As células do carcinoma tubulopapilífero cístico, apresentaram formato epitelióide, como anteriormente descrito, com contato celular quase total e se apresentaram viáveis e com período de confluência de aproximadamente 24 a 48 horas até a vigésima passagem, tempo em que foram armazenadas em nitrogênio líquido.

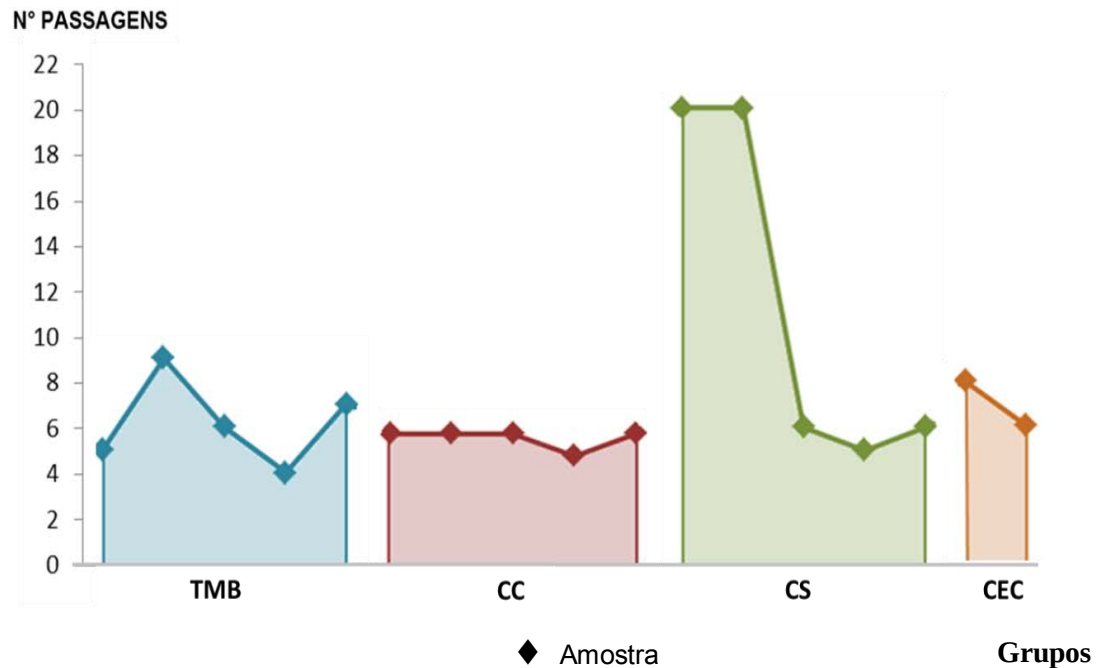


FIGURA 10 – Culturas celulares distribuídas de acordo com o grupo histológico e o número de passagem que cada amostra apresentou até a senescência ou contaminação bacteriana. (TMB = Tumor misto benigno, CC = Carcinoma complexo, CS = Carcinoma simples e CEC = Carcinoma espinocelular).

Testes com imunomarcadores

Ao se comparar o que fora observado no tumor original em relação ao seu respectivo cultivo na quinta passagem, verificou-se que em relação à frequência, a citoqueratina manteve expressão similar entre grupos, sem diferença significativa. No entanto, foi a única em que a expressão do imunomarcador foi superior no método de imuno-histoquímica (tumor primário), do que na imunofluorescência (cultivo celular). A citoqueratina apresentou expressão em variados graus de intensidade em 100% dos tumores à imuno-histoquímica, e em 82% à imunofluorescência, sendo ausente em dois carcinomas tubulopapilíferos e um tumor misto benigno.

A vimentina, HER-2 e proteína p53 apresentaram diferença significativa entre os métodos, todos com marcação superior na imunofluorescência. A vimentina foi expressa em 100% em ambos os métodos. A p53 foi expressa

com marcação nuclear e citoplasmática em 53% do tumor primário e em 82% dos seus respectivos cultivos. Por fim, a expressão de HER-2 ocorreu em 53% na imuno-histoquímica e em 82%, na imunofluorescência. Na Tabela 3 é possível visualizar a expressão média de cada marcador de acordo com a metodologia utilizada.

Tabela 3 - Valores de média ($\bar{x}$), desvio padrão (S) e mediana (Md) da frequência em porcentagem, segundo o método utilizado para cada marcador nos tumores mamários e seus respectivos cultivos

Marcador	Imuno-histoquímica		Imunofluorescência		p⁽¹⁾
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	
Citoqueratina	47,2 $\pm$ 25,8	50,0	35,1 $\pm$ 36,5	18,5	0,1928
Vimentina	44,1 $\pm$ 22,4	45,0	85,6 $\pm$ 21,6	90,0	0,0001
p53	12,6 $\pm$ 21,0	2,5	37,7 $\pm$ 37,2	26,0	0,0295
HER-2	12,1 $\pm$ 14,9	4,5	43,4 $\pm$ 39,9	25,0	0,0203

⁽¹⁾ Teste de Wilcoxon

A intensidade de marcação, mensurada em escores, apresentou diferença significativa apenas para a vimentina. Em 50% ou mais das amostras, houve equivalência nas duas técnicas para a citoqueratina e vimentina. Para o HER-2 e p53, a imunofluorescência apresentou intensidade maior em 40% ou mais dos casos. Na Tabela 4 é possível observar os valores medianos de cada marcador de acordo com a técnica utilizada e nas FIGURAS 11 e 12, a imunomarcação segundo a frequência e escore pode ser visualizada no método de imuno-histoquímica e imunofluorescência.

Tabela 4 - Valores medianos (Md), mínimos (Min) e máximos (Max) da intensidade em escores, segundo o método utilizado para cada marcador nos tumores mamários e seus respectivos cultivos

Marcador	Histoquímica		Fluorescência		p ⁽¹⁾
	Md	Min – Max	Md	Min – Max	
Citoqueratina	2	1 – 3	2	0 – 3	0,3125
Vimentina	3	1 – 3	3	2 – 3	0,0625
p53	1	0 – 2	2	0 – 2	0,1934
HER-2	1	0 – 3	2	0 – 3	0,3258

⁽¹⁾ Teste de Wilcoxon

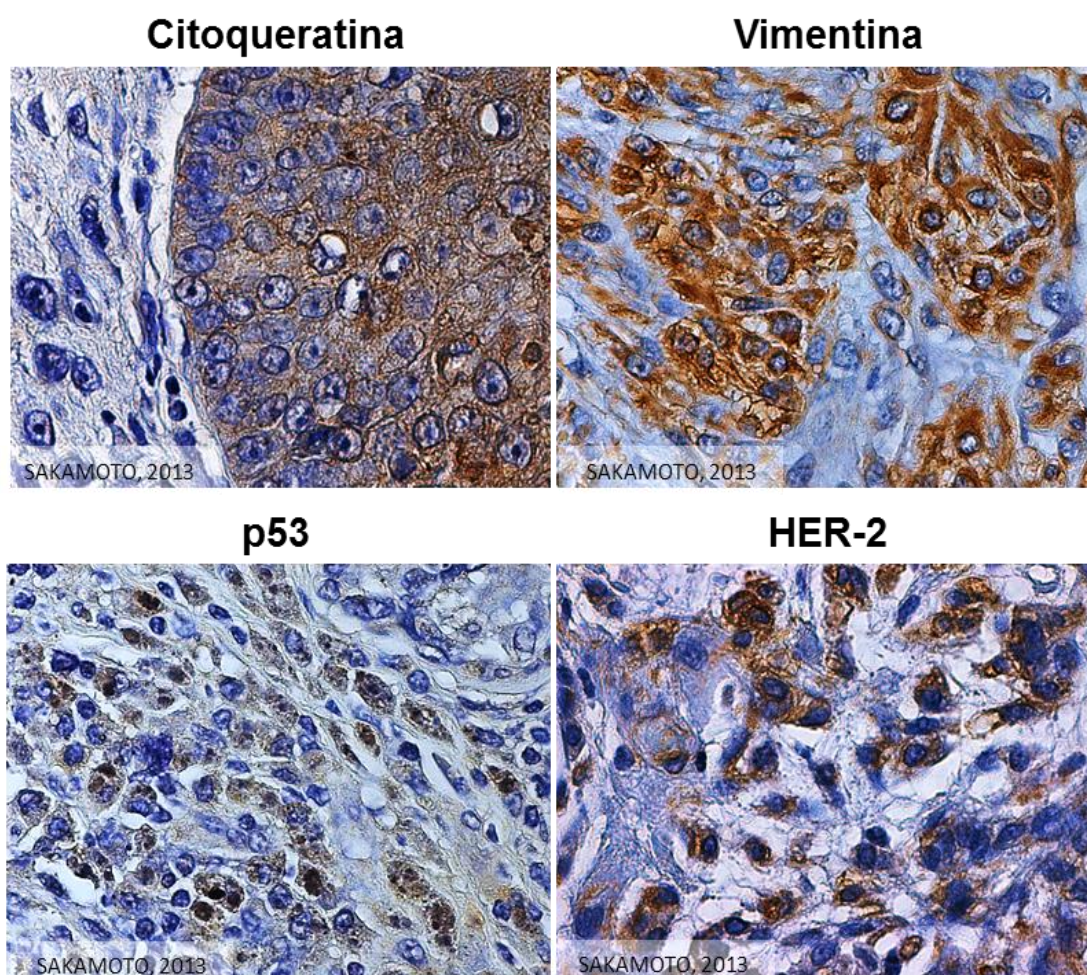


FIGURA 11 – Fotomicrografia de método imuno-histoquímico em tumor de mama canino de acordo com o imunomarcador (microscopia óptica, aumento 100x).

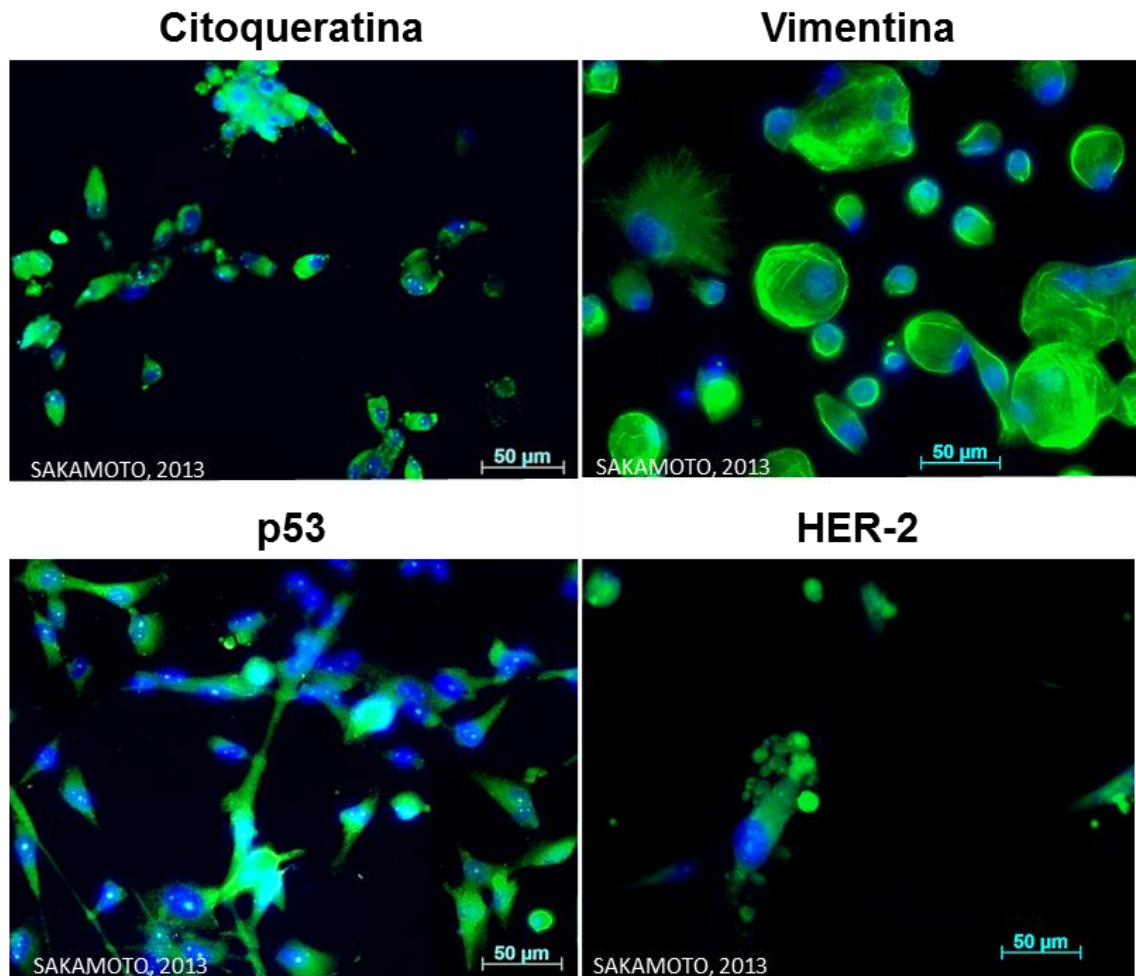


FIGURA 12 – Fotomicrografia de método de imunofluorescência em tumor de mama canino de acordo com o imunomarcador (microscopia invertida, aumento 40x).

Apesar do CS representar o carcinoma simples, com células de origem epitelial à histologia, na imunofluorescência, todos os cinco representantes deste grupo, constituído por duas amostras de carcinoma tubulopapilífero, duas de carcinoma sólido e uma de carcinoma anaplásico, apresentaram marcação positiva no método de imunofluorescência da vimentina em variados graus, mesmo sendo esta caracterizada por ser expressa em células de origem mesenquimal (FIGURA 13).

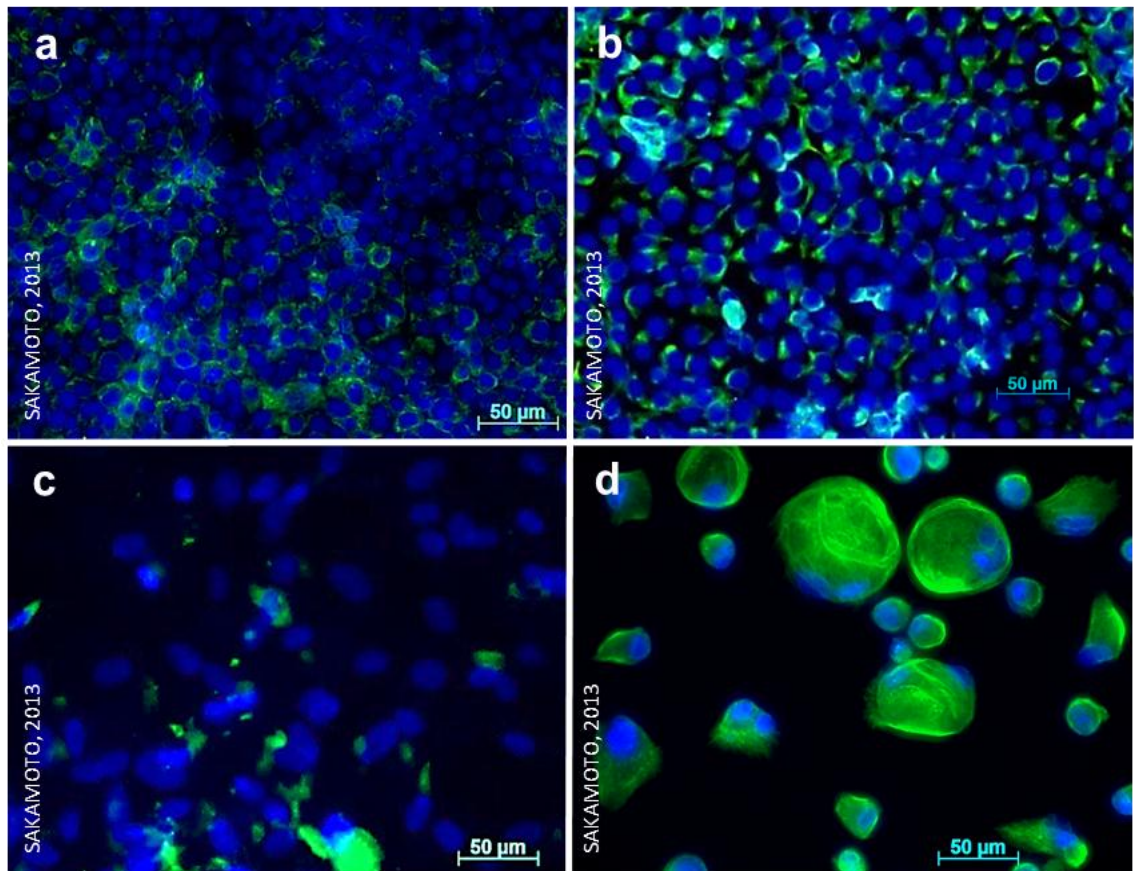


FIGURA 13 – Reação positiva de imunofluorescência do anticorpo anti-vimentina no grupo carcinoma simples (microscopia invertida, aumento 100x). a e b) Carcinoma tubulopapilífero cístico. c) Carcinoma sólido. d) Carcinoma anaplásico.

Imunomarcacão com o anticorpo anti-p63

A proteína p63 foi analisada com o intuito de se observar uma possível contaminação com fibroblastos. Houve marcação em praticamente todos os cultivos, confirmando a origem mioepitelial das células (FIGURA 14).

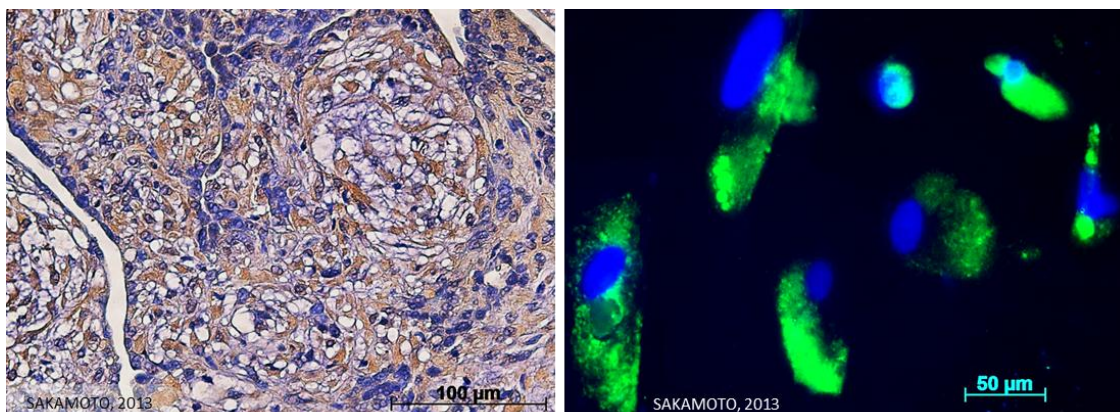


FIGURA 14 – Imunoexpressão do anticorpo anti-p63 em tumores mamários de cadelas. Técnica de imuno-histoquímica no tumor original (esquerda) e de imunofluorescência (direita) nos respectivo cultivo celular.

Testes quimioterápicos

Em relação ao tratamento utilizado, de forma geral, encontrou-se uma resposta dose-dependente. Quanto maior a concentração da doxorrubicina, menor a viabilidade celular encontrada (Tabela 5; FIGURA 15). De acordo com o grupo histológico, não houve diferença significativa em relação a resposta ao tratamento utilizado. O TMB, CC e CS apresentaram viabilidades similares (Tabela 6; FIGURA 15). O CEC não foi avaliado neste parâmetro por conter poucas amostras (duas).

A análise individual de cada cultivo dentro dos diferentes grupos histológicos revelou um comportamento heterogêneo das células frente ao tratamento com doxorrubicina. Cada cultura apresentou sensibilidade distinta às diferentes concentrações do quimioterápico e o CS foi o que apresentou maior homogeneidade dos resultados, conforme visualizado na FIGURA 16. A viabilidade em torno de 50% pôde ser verificada no tratamento de 0,25 µM na maioria dos cultivos celulares.

Tabela 5 - Valores médios ($\bar{x}$), desvios-padrão (S) e mediana (Md) da viabilidade celular (%) de acordo com a concentração da doxorubicina, nas 17 amostras tumorais mamárias de cadelas.

Doxorrubicina	Viabilidade Celular (%)	
	$\bar{x} \pm S$	Md
Controle	90,4 $\pm$ 8,1	90,9 ^a
0,25 μM	50,8 $\pm$ 23,2	58,4 ^{ab}
0,5 μM	14,8 $\pm$ 10,6	16,7 ^{bc}
0,75 μM	3,9 $\pm$ 6,1	1,3 ^{cd}
1 μM	1,3 $\pm$ 3,2	0,0 ^d
2 μM	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 ^d

Medianas seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si (p < 0,05)

Tabela 6 - Valores médios ($\bar{x}$), desvios-padrão (S) e mediana (Md) da viabilidade celular (%), segundo a concentração da doxorubicina e o grupo histológico, nas 15 amostras tumorais de cadelas

Doxorrubicina	Tumor Misto Benigno (TMB)		Carcinoma complexo (CC)		Carcinoma simples (CS)	
	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md	$\bar{x} \pm S$	Md
Controle	88,9 $\pm$ 9,3	88,7 ^a	89,7 $\pm$ 10,0	85,7 ^a	92,9 $\pm$ 3,3	93,6 ^a
0,25 μM	41,5 $\pm$ 16,8	41,8 ^{ab}	48,8 $\pm$ 25,0	44,7 ^{ab}	66,3 $\pm$ 8,5	61,5 ^a
0,5 μM	23,5 $\pm$ 11,9	22,7 ^{abc}	10,3 $\pm$ 9,6	14,7 ^{ab}	15,0 $\pm$ 5,6	16,7 ^{ab}
0,75 μM	7,6 $\pm$ 9,4	4,0 ^{bc}	1,1 $\pm$ 1,8	0,0 ^b	1,6 $\pm$ 2,7	0,6 ^b
1 μM	3,0 $\pm$ 5,7	0,8 ^{bc}	0,5 $\pm$ 1,1	0,0 ^b	0,3 $\pm$ 0,6	0,0 ^b
2 μM	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 ^c	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 ^b	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 ^b

TMB=CC=CS. Medianas seguidas de letras distintas, na coluna, diferem entre si (p < 0,05)

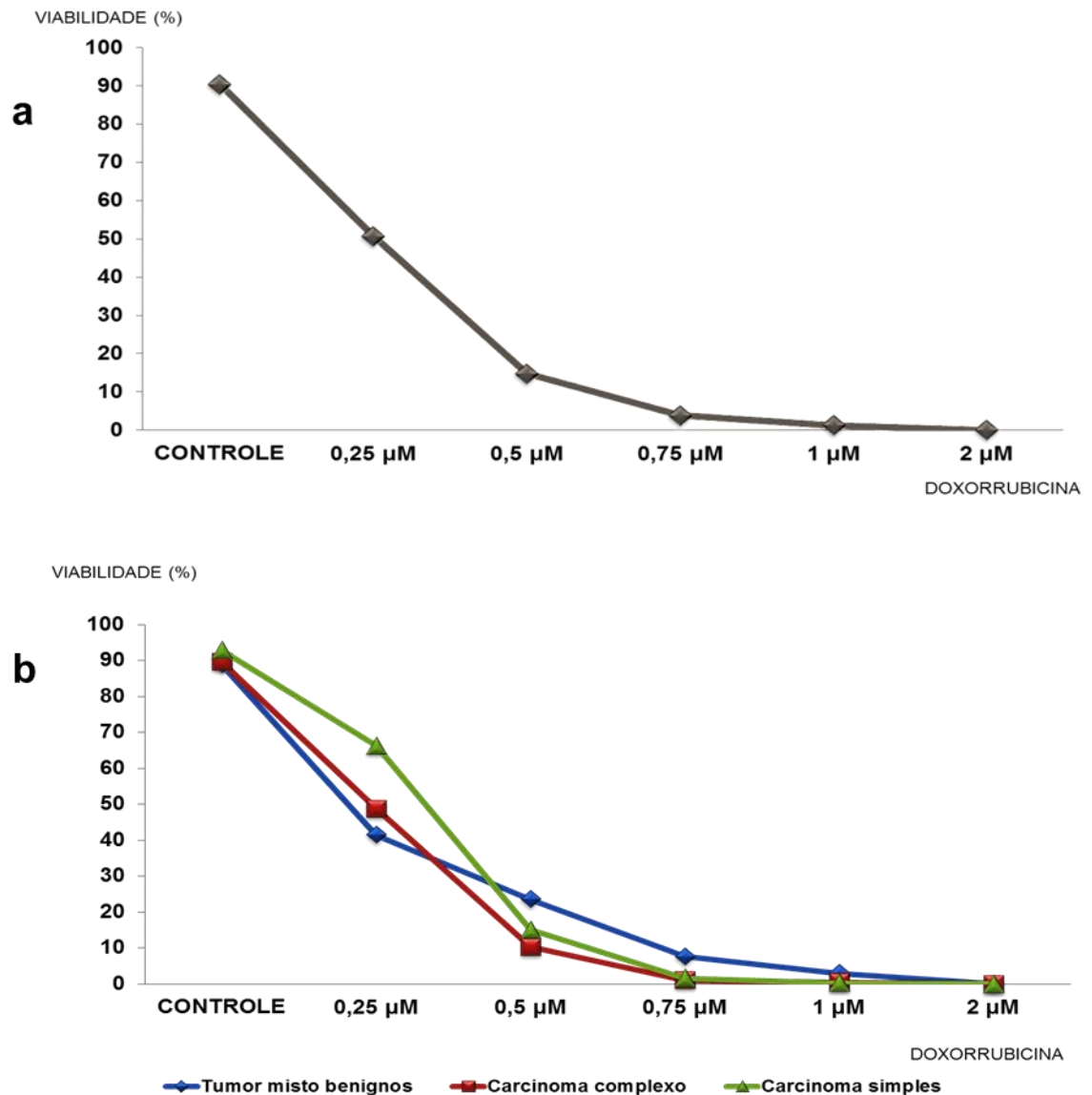


FIGURA 15 – a) Gráfico representativo da média de viabilidade celular (%) dos cultivos celulares de tumores mamários de cadelas, após o tratamento com doxorrubicina em diferentes concentrações durante 24 horas. a) Média final de todas as culturas mamárias tumorais (17 amostras). b) Média de acordo com os grupos histológicos (tumor misto benigno, carcinoma complexo e carcinoma simples - 15 amostras).

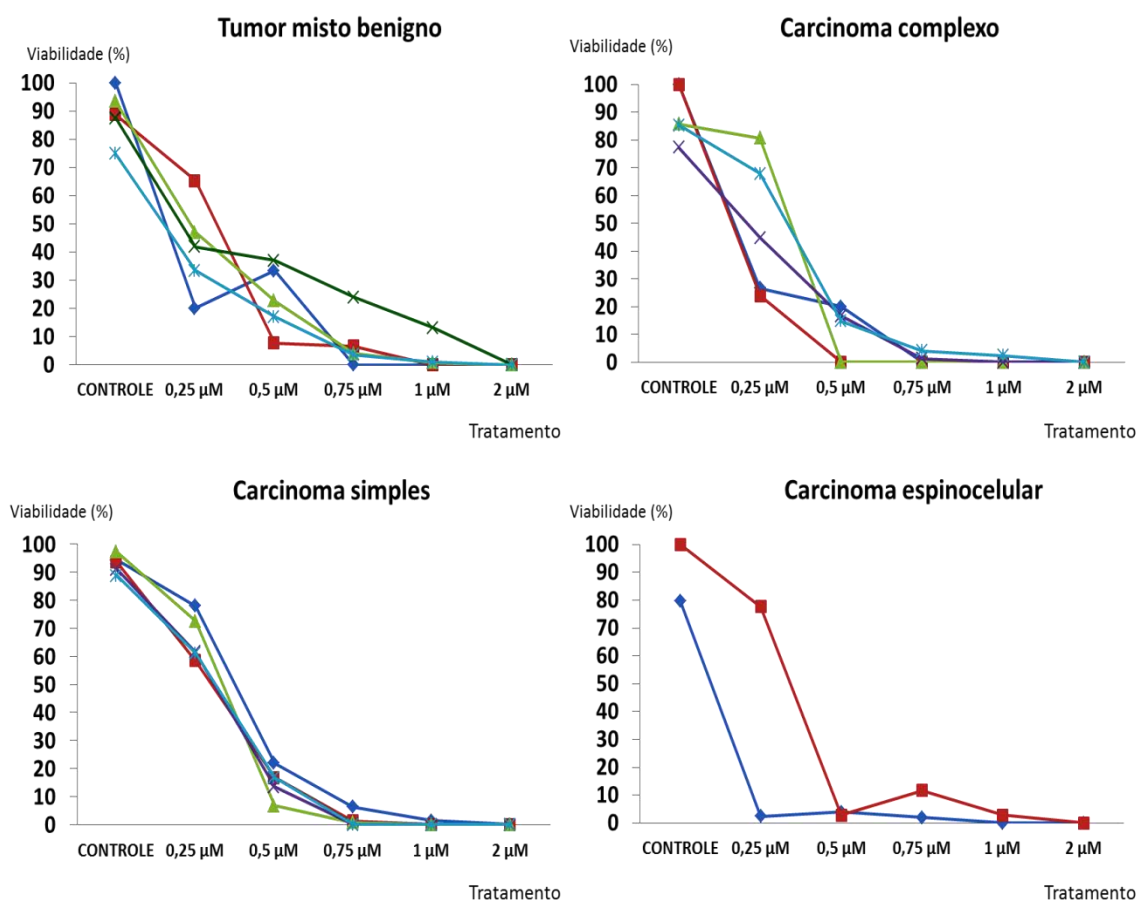
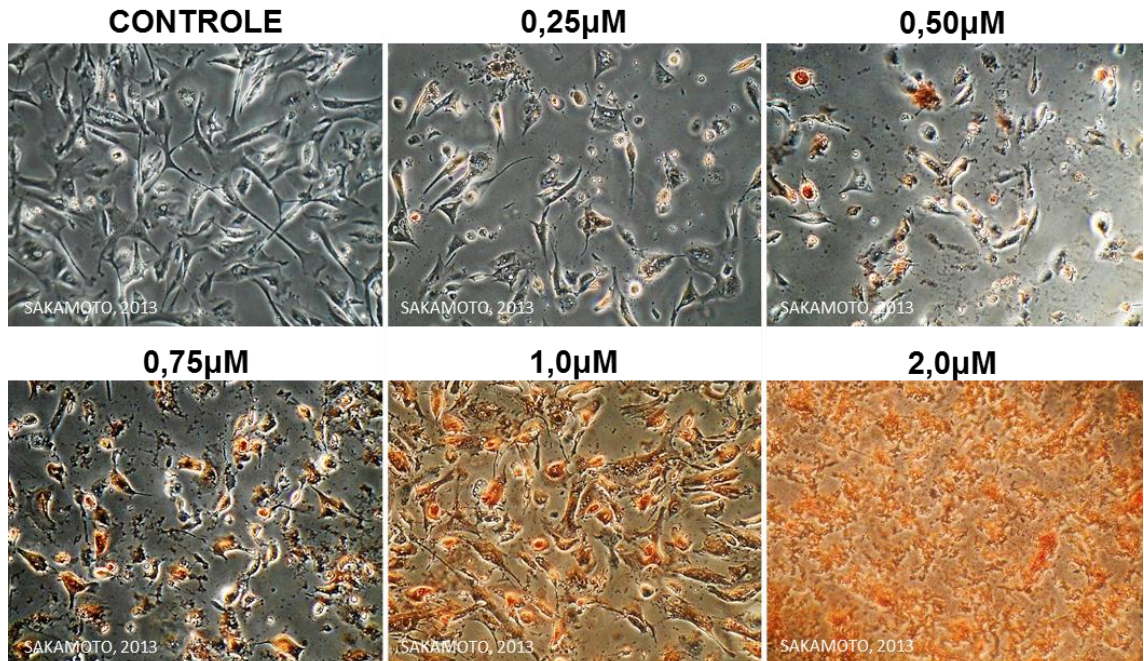


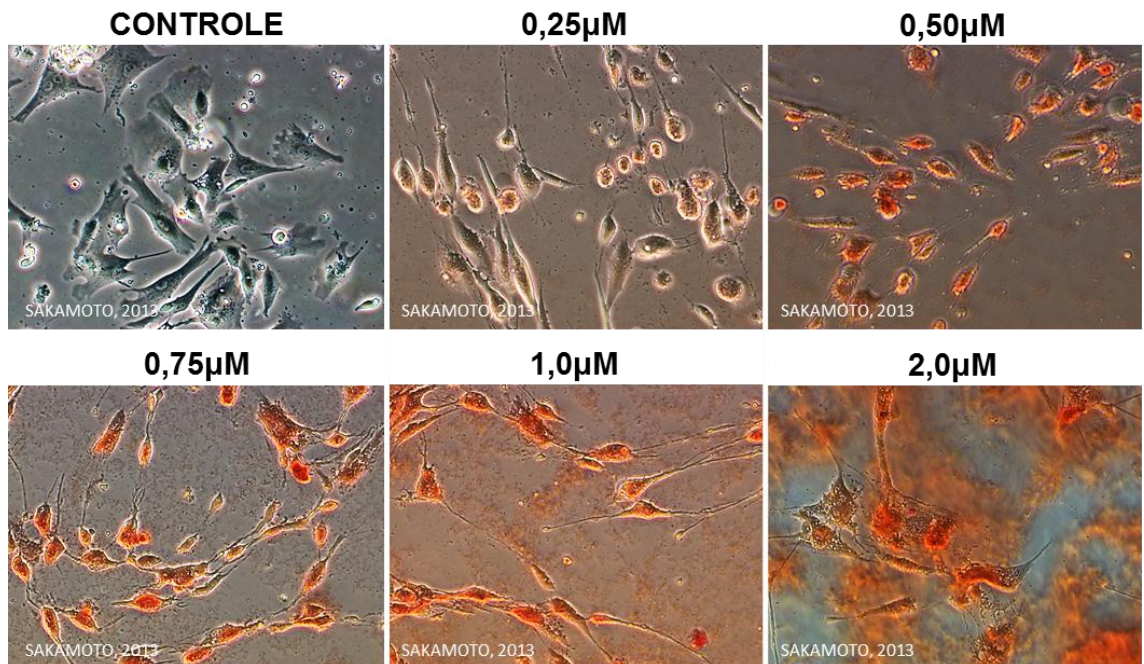
FIGURA 16 – Gráfico representativo de cada uma das amostras dos grupos tumor misto benigno, carcinoma complexo, carcinoma simples e carcinoma espinocelular. Visualiza-se a diferença nas porcentagens de viabilidades celulares entre os grupos histológicos e entre as amostras de cada grupo, identificando o comportamento individual de cada tumor frente à doxorubicina nas diferentes concentrações.

A FIGURA 17 ilustra o comportamento das células tumorais mamárias após 24 horas de exposição com o quimioterápico doxorubicina em um representante de cada grupo histológico avaliado.

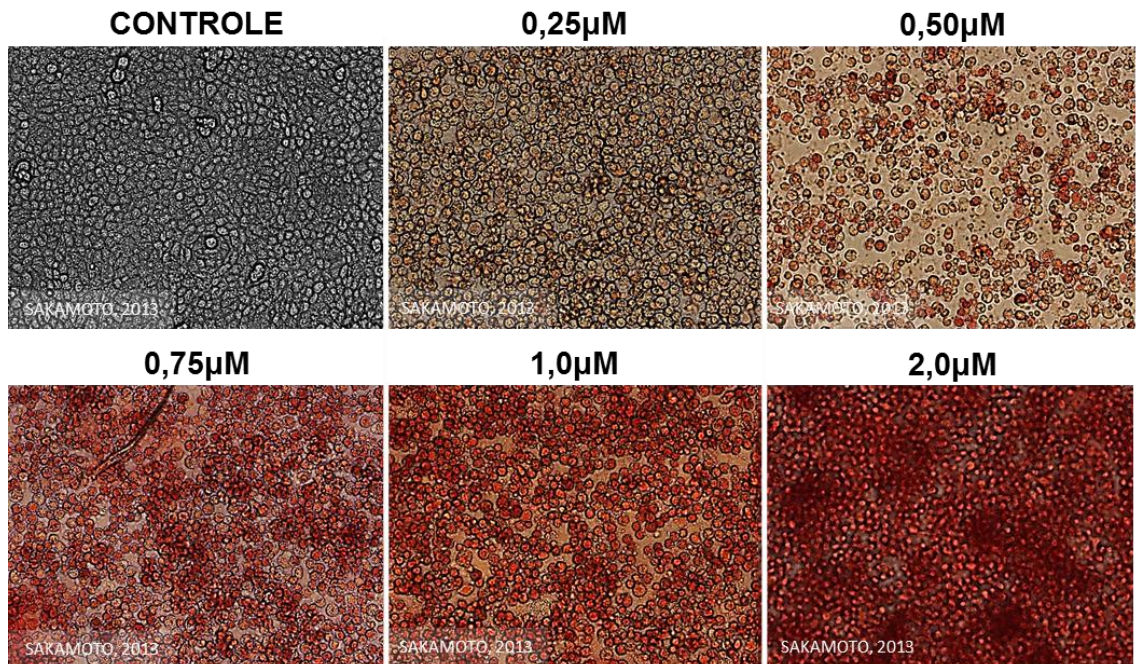
TUMOR MISTO BENIGNO



CARCINOMA COMPLEXO



CARCINOMA SIMPLES



CARCINOMA ESPINOCELULAR

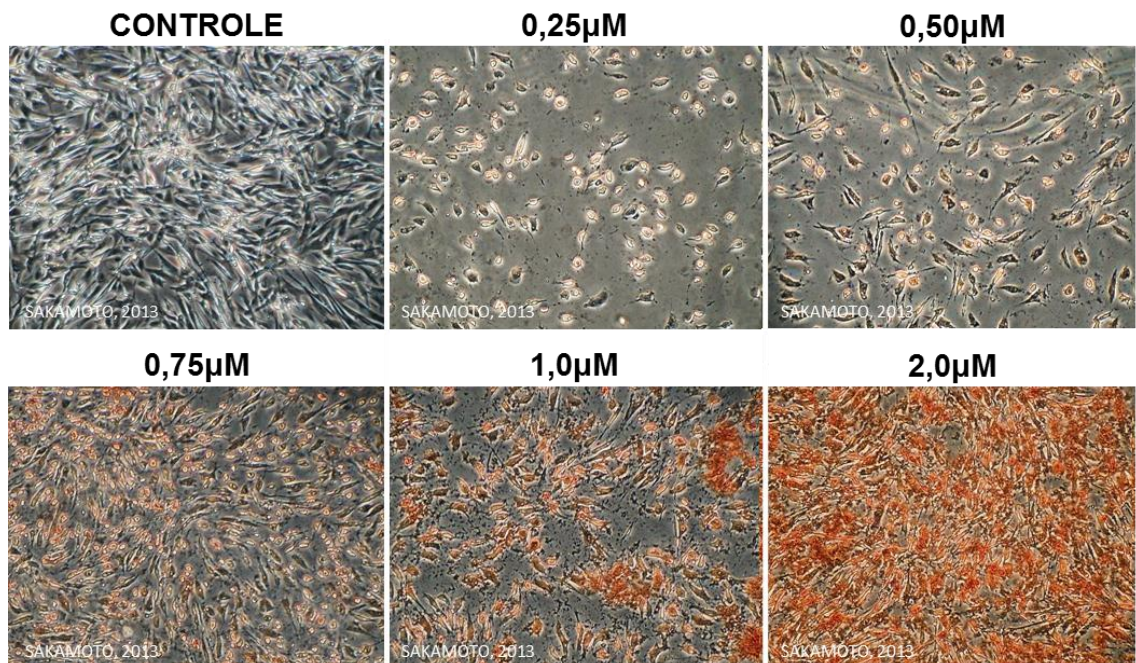


FIGURA 17 – Fotomicrografia de culturas celulares de tumores mamários de cadelas (microscopia invertida, aumento de 40x). Nota-se que quanto maior a concentração do antibiótico, mais intensa é a coloração avermelhada decorrente do acúmulo de doxorubicina no tapete celular e no sobrenadante.

VI DISCUSSÃO

Cultivo celular

Para a obtenção das amostras teciduais tumorais mamárias, 22 cadelas foram selecionadas de forma aleatória dentro da rotina cirúrgica, perfazendo o total de 39 amostras. Delas, provenientes de 13 cadelas, 44% (17/39) foram cultivadas até a quinta passagem e alocadas em quatro grupos histológicos, sendo um benigno e três malignos. A morfologia celular dos diferentes grupos foi distinta entre e dentro os grupos. A grande maioria apresentou morfologia fibroblastoide, provavelmente originária do componente mesenquimal do tumor primário (HELLMÉN, 1992; HELLMÉN et al., 2000). Apenas os representantes do carcinoma tubulopapilífero (CC) apresentaram morfologia epitelióide.

De acordo com o número de dias até a quarta passagem que cada cultura levava para atingir a confluência total, houve um decréscimo em relação às passagens iniciais. A quarta passagem necessitou de menos dias para atingir a confluência quando comparada à segunda. Isso ocorreu, provavelmente, pelo fato do período de adaptação das células ao plástico da garrafa. Originalmente, as amostras teciduais possuem caráter heterogêneo, gerando culturas com variados tipos celulares que, após uma ou duas passagens, começam a assumir um comportamento mais homogêneo, com o predomínio do tipo celular daquelas que mais se adaptaram ao novo ambiente, sob um sistema controlado laboratorialmente (FRESHNEY, 2010).

A partir da quinta passagem, alguns cultivos com células fibroblastóides já iniciaram o processo de senescência, representado pela parada na multiplicação celular e presença de vacuolizações citoplasmáticas com aumento no volume celular. Sabe-se que, as culturas primárias obtidas diretamente de um órgão ou tecido animal, possuem uma capacidade proliferativa limitada e, após determinado número de divisões celulares, as células podem entrar em um processo de senescência (SULTAN; HAAGSMAN, 2001).

Esse processo pode ter sido antecipado pela provável necessidade de algum suplemento ao meio celular, indicando também a possível troca do tipo de meio de cultivo, já que as células que foram incubadas com um meio seletivo epitelial (em estudos complementares), todas as amostras adquiriram característica de célula epitelióide, independente da morfologia original e, apresentaram viabilidade até a sexagésima ou superior passagens.

Em relação à contaminação bacteriana, o grupo do carcinoma complexo foi o que apresentou as maiores perdas, provavelmente relacionado ao tumor original, já que a maioria das amostras era resultante de tumores com grandes volumes, nos quais as células já poderiam estar em fase de degeneração. Esse grupo histológico possui a característica de crescimento macroscópico expansivo (MISDORP et al., 1999).

As linhagens celulares pré-estabelecidas comercialmente, já se encontram pronta para uso em testes laboratoriais e, exclui a obrigatoriedade de métodos como a desagregação mecânica e enzimática de tecidos, fase esta imperativa nos cultivos primários. De uma amostra congelada ou fresca, deve-se originar os explantes que darão início às linhagens celulares a serem estabelecidas (FRESHNEY, 2000). Como debridamento químico, a enzima proteolítica collagenase é amplamente difundida com protocolos de duração de várias horas (HELLMÉN, 1992; SIMON et al., 2001; HELLMÉN et al., 2000) e, com conhecida ação superior a demais enzimas, como a tripsina, apesar de ser mais nociva à célula (FRESHNEY, 2000). No presente estudo, o período mínimo de duas horas, em temperatura de 37°C, seguido por lavagem com tripsina-EDTA, foi padronizado e com resultados satisfatórios para o debridamento celular.

O meio de cultivo utilizado foi básico e comercialmente pronto. De início, optou-se pelo RPMI, com posterior troca para o DMEM, e suplementação apenas de SFB, suspensão de antibiótico-antimicótico e L-glutamina. A escolha pela troca do meio RPMI 1640 pelo DMEM após a retirada dos explantes (segundo dia), ocorreu pela melhor adaptação das células tumorais, sob condições de temperatura de 38,5 °C e 5% CO₂, previamente testadas. Quando

incubadas com RPMI 1640 por tempo prolongado, algumas células apresentaram maior período para atingirem a confluência, além de alteração na morfologia (vacuolização, aumento da quantidade de citoplasma).

Sabe-se que de acordo com a formulação do meio celular comercial (como aminoácidos, vitaminas, elementos traço, proteínas, sais inorgânicos, além de outros componentes como glicose e pH) pode-se induzir ou retardar a proliferação, diferenciação e viabilidade celulares (WU et al., 2009). Noding et al. (1998) avaliaram o efeito de ácidos graxos poli-insaturados, frente a diferentes meios de cultivo celulares e, identificaram que, linhagens de células tumorais possuem sensibilidade distintas em relação ao crescimento celular e aos efeitos citotóxicos dependentes do tipo do meio utilizado.

As células não tumorais também podem se desenvolver de forma diferente em cada meio de cultivo. Células derivadas do periósteo canino apresentaram melhor comportamento em relação à diferenciação osteogênica, quando expostas ao meio DMEM (baixa glicose), em relação ao RPMI 1640, ambos com adição de SFB (WU et al., 2009). A maior diferença entre os meios foi a concentração de glicose previamente fornecida pelo fabricante, com valores quase que duas vezes e meia superior no DMEM.

As diferenças básicas entre o DMEM e o RPMI, além da taxa de glicose, incluem maior concentração de cálcio e menor de fosfatos no DMEM (WU et al., 2009), que pode afetar a proliferação celular e o processo de senescência (STOLZING et al., 2006; LI et al., 2007). A adição de certos compostos ao meio celular também pode variar consideravelmente o desenvolvimento da célula estudada. Torii et al. (2011) avaliaram o efeito de um mimetizador químico de hipóxia (cloridrato de cobalto) em células tumorais mamárias (MCF-7) cultivadas em DMEM ou RPMI, adicionado de 10% SFB e, verificou que, a concentração superior de histidina no DMEM levou a menor formação de radicais livres, responsáveis pela queda na viabilidade celular.

O meio de cultivo composto pelo RPMI 1640 acrescido de 10% SFB e suspensão de antibiótico-antimicótico é amplamente difundido tanto para o cultivo de linhagens celulares tumorais mamárias já estabelecidas (KROL et al.,

2009; MICHISHITA et al., 2011), quanto para o cultivo primário a partir de explantes (HELLMÉN, 1992; PAWLOWSKI et al., 2009; HELLMÉN et al., 2000), sob condições de 5% CO₂ e 37°C ou de 20% soro bezerro bovino, 10% CO₂ e 37°C (SIMON et al, 2001).

Cada laboratório possui particularidades de cultivo para melhor adaptação da técnica de acordo com o tecido analisado. Dessa maneira, conseguimos padronizar uma mesma metodologia para o cultivo de tumores mamários de cadelas a fresco, de variados tipos histológicos, inclusive os benignos. Inicialmente, esse protocolo possui resultados satisfatórios que atendem ao objetivo de se estabelecer cultivos tumorais, mas que necessitam de complementos de acordo com o tipo celular a ser estudado, inclusive para aplicações futuras do cultivo tridimensional.

Testes com imunomarcadores

A escolha do método imuno-histoquímico nos blocos parafinizados justificou-se porque neles há a manutenção da arquitetura histológica do tumor, cujos registros fotográficos apresentam qualidade superior aos da imunofluorescência. Já nos cultivos celulares, optou-se pela imunofluorescência para que a visualização da intensidade e frequências dos marcadores celulares fossem facilitadas.

Portanto, ao se comparar o que fora observado no tumor original em relação a seu respectivo cultivo na quinta passagem, verificou-se que em relação à frequência e intensidade houve diferença significativa entre as técnicas. A imunofluorescência foi mais sensível em relação a vimentina, Her-2 e proteína p53. Provavelmente, como a ligação do anticorpo ocorreu de forma direta sobre as células e não havia interferência de outros constituintes dos tecidos, a reação foi mais específica e direta, já que para a realização da imuno-histoquímica, os tecidos foram previamente fixados em solução de formaldeído que diminui a reatividade antigênica da amostra (MERA et al., 1980).

A caracterização dos tumores de acordo com a sua origem celular foi realizada pela marcação com os anticorpos vimentina (que marca células de origem mesenquimal e células mioepiteliais) e citoqueratina (origem epitelial). Embora a marcação esperada com citoqueratina tenha apresentado frequência inferior do que a vimentina, pela natureza histológica dos tumores, o anticorpo utilizado (clone PCK-26) não foi o mais apropriado para marcar as células epiteliais da glândula mamária canina em ambos os métodos. Em alguns tumores, esperava-se que as células epiteliais fossem marcadas, o que não ocorreu. E, ao contrário dos demais marcadores, sua expressão foi maior no método imuno-histoquímico, no qual também pôde se verificar a maior expressão e intensidade nos carcinomas espinocelulares.

Indica-se que vários clones diferentes sejam utilizados para os filamentos de citoqueratina, como 6 e 18 (HELLMÉN, 1992; HELMÉNN et al., 2000). A citoqueratina esteve marcada em variados graus de intensidade em 100% dos tumores à imuno-histoquímica, e ausente em três deles, pela imunofluorescência, sendo dois carcinomas tubulopapilíferos e um tumor misto benigno.

A imunomarcação com vimentina ocorreu em 100% dos tumores, em ambos os métodos. Como no cultivo a frequência de marcação aumentou, suscita-se o predomínio de células não epiteliais, tanto mioepiteliais quanto fibroblastos. Para tanto, foi necessário adotar a imunomarcação da proteína p63, que identifica as células mioepiteliais da mama humana, sem marcar os fibroblastos (BOTELHO, 2009; GAMA, 2009). O p63 é um membro da família p53 e tem expressão nuclear nas células mioepiteliais, localizados ao redor dos ductos e lóbulos da glândula mamária (REIS-FILHO;SCHMITT, 2002; STEFANOU et al., 2004) e com importância no processo de ejeção do leite durante a lactação. Houve marcação em praticamente todos os cultivos, confirmando a origem mioepitelial das células.

Esperava-se que no CS, carcinoma simples composto por tecido histológico predominantemente epitelial e resultando em cultivo de células epitelioides e fibroblastoides, resultasse em reação positiva e superior da

citoqueratina. Porém, a vimentina foi moderada a altamente expressa nos cultivos do referido grupo, como pode ser visualizado na FIGURA 18. A expressão de vimentina em células não mesenquimais pode ser resultado de uma forma de adaptação, perda da orientação tridimensional das células e perda das moléculas de adesão, como a E-caderina ou como invasividade relacionado a carcinomas (ARAÚJO et al., 1993; GILLES et al., 1999).

A p53 esteve expressa com marcação nuclear e citoplasmática em cerca de 23% dos tumores e 47% dos seus respectivos cultivos, com níveis acima de 30% de frequência (FIGURA 30). Rungsipipat et al., 1999 avaliaram a expressão da p53 em tumores mamários benignos e malignos de cadelas e, concluiu que a p53 é expressa em todos os estágios do tumor, sendo nos benignos um possível indicador de fator de risco para ocorrência de malignidade futura (ROHAN et al., 1998; BERTAGNOLLI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011). Teixeira et al. (2011) avaliaram mamas normais, tumorais e sadias contralaterais e em cadelas sadias, e observaram que a proteína não foi expressa já que quando a atividade da p53 está normal, sua meia-vida é curta e a mesma não é detectada pela imuno-histoquímica. Apesar de ser uma proteína nuclear, a expressão citoplasmática pode ocorrer em consequência do sequestro da proteína alterada para o citoplasma e, pode indicar uma nova via e sinalização desses tumores, sendo até uma nova transformação para um fenótipo mais agressivo (TEIXEIRA et al., 2011).

A expressão de HER-2 aumentou nos cultivos em relação ao tumor original. Em quase todos os grupos houve marcação em graus variados no cultivo, apesar da marcação de tumores benignos, ainda ser controversa na literatura. Rungsipipat et al. (1999) avaliaram 79 tumores mamários e tanto nos benignos (50%), quanto nos malignos (19,1%) observaram marcação positiva. De las Mulas et al. (2003), encontraram positividade em 17,6% dos carcinomas mamários de cadelas e reação negativa em todas as suas amostras de benignos, associando a superexpressão com os piores prognósticos, assim como na medicina humana (SLAMON et al., 1987). Ainda, Ressel et al. (2013) ressaltaram o aumento da proteína nos tecidos normais e

hiperplásicos/displásicos de localização adjacente aos carcinomas de cadelas. Na medicina humana, o HER-2 está ainda associado aos tumores mais agressivos e de piores prognósticos (SLAMON et al., 1987; SLAMON et al., 1989; ROSS et al., 2003). E acreditamos que o mesmo possa ser inferido aos tumores mamários caninos, no entanto, dados contraditórios em relação à medicina humana sugerem que o HER-2 tenha um papel na proliferação do tecido da glândula mamária de cadelas, mas provavelmente não está associado a transformação maligna das mesmas (RESSEL et al., 2013).

Já a intensidade de marcação, mensurada em escores apresentou diferença apenas para a vimentina. Em 50% ou mais das amostras, houve equivalência nas duas técnicas para a citoqueratina e vimentina. Para o HER-2 e p53, a imunofluorescência apresentou intensidade maior em 40% ou mais dos casos. Tal concordância pode estar relacionada ao fato de que graduação por escore é menos sensível do aquela obtida por porcentagem.

Apesar do método de imunofluorescência ter se apresentado sensível aos anticorpos utilizados para a marcação de citoqueratina, vimentina, p53 e HER-2, novos estudos deverão ser conduzidos para se avaliar melhor a expressão de imunomarcadores e sua correlação entre o tumor primário e as células resultantes de seu cultivo. O estudo da expressão de genes também pode contribuir nesse objetivo como realizado por Pawlowski et al. (2009) que encontraram similaridade de expressão acima de 94% para todos os genes estudados em relação ao tumor original e seu respectivo cultivo de adenocarcinoma mamário e acima de 97% para o condrossarcoma mamário de cadelas.

Testes in vitro com a doxorrubicina

Os testes in vitro com a doxorrubicina foram realizados com o objetivo de se avaliar a eficácia do fármaco, de acordo com a concentração estipulada e o tipo histológico da cultura (grupos 1 a 3). O teste de viabilidade celular em câmara hemocitométrica foi realizado pelo método de exclusão com azul de

Tripan, que corresponde a um corante recomendado para marcação de células inviáveis. O seu uso é praticado em testes *in vitro* de viabilidade celular, apesar de se tratar de um método acessível, o mesmo torna-se pouco prático quando a rotina laboratorial é intensa e dispense de certo tempo para a sua execução.

Justifica-se a escolha pela doxorrubicina, por se tratar de um quimioterápico amplamente utilizado, de baixo custo e, com base em estudos prévios, que demonstraram sua eficácia em tumores mamários humanos e caninos (PARIDAENS et al., 2000; SIMON et al., 2001; SORENMO, 2003). Porém, seu uso em medicina veterinária deve ser cauteloso, pelos seus possíveis efeitos colaterais, principalmente aos cardíacos, gastrointestinais e hematológicos (RODASKI; DE NARDI, 2008). As doses escolhidas fundamentaram-se em relatos prévios (SIMON, et al., 2001; SOBRAL, 2006) e foi necessária a transformação da dose de miligramas por quilo (mg/Kg) para micromolares (μM).

Em relação à dose (tratamento) utilizada nas culturas celulares, é concebido que quanto maior a concentração, menor será a viabilidade celular encontrada (dose-dependente). O mesmo foi observado neste estudo, como também visualizado por Simon et al. (2001) e Mahéo et al. (2005). As diferenças foram significativas entre os grupos controle e dose=0,25 μM em relação aos grupos dose=0,75 – 1,0 – 2,0 μM . Independente do grupo histológico, as maiores taxas de viabilidade celular foram encontradas nos grupos controle e 0,25 μM .

SIMON et al. (2001) relataram uma concentração inibitória eficaz de 50%, nos testes empregando a doxorrubicina em culturas de células tumorais mamárias de cadelas, com valores de 0,22 a 3,13 μM (média de 0,84 μM), após 24 horas de tratamento. E dose média de 0,34 e 0,28 μM , após 24 e 48 horas, respectivamente. No presente estudo, a viabilidade celular esteve próxima de 50% quando empregou-se uma concentração de 0,25 μM , após 24 horas. Sobral (2006) utilizou as concentrações maiores (de 1 μM e 2 μM) em testes *in vitro*, no entanto, com fragmentos teciduais ao contrário do que se foi utilizado neste estudo, o que nos impede de comparar os resultados.

Embora os grupos histológicos tenham se comportado de forma similar, sem diferença significativa (entre grupos histológicos e entre tratamentos), assim como descreveram SIMON et al. (2001) para os tumores mamários analisados (adenocarcinoma, carcinoma sólido e tumor misto maligno), algumas variações ocorreram de forma individualizada. As culturas, considerando-nas como cada paciente, apresentaram viabilidades celulares distintas quando os valores em cada tratamento (dose) foram avaliados. O resultado de 100% de morte celular variou a partir da dose de 0,5 μ M até a concentração de 2 μ M. Mahéo et al. (2005) também encontraram viabilidades celulares distintas e concentração inibitória mínima em 50% das células, de acordo com a linhagem celular testada, sendo duas sensíveis à doxorrubicina (MCF-7 e MDA-MB-231) e uma resistente (MCF-7dox).

O grupo controle também apresentou diferenças na viabilidade celular, com valores entre 75 a 100% de células viáveis. A morte de até 25% das células neste grupo ocorreu de forma natural, já que todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de temperatura, CO₂, meio de cultivo (e suplementações) e tempo de avaliação.

Quando o teste terapêutico foi comparado individualmente dentro de cada grupo, considerando cada amostra como um paciente único, cada cultura se comportou de forma individual e o CS foi aquele com maior similaridade nos valores de viabilidade celular entre os indivíduos, mesmo sendo este o grupo com os três tipos de carcinoma: tubulopapilífero, sólido e anaplásico (MISDORP et al., 1999). Dessa forma, foi possível visualizar que o comportamento celular, referente à viabilidade das células, altera-se frente ao tratamento exposto, tanto nos grupos histológicos como individualmente em cada amostra. Assim, o mais recomendado quando se deseja extrapolar os testes terapêuticos para a prática clínica, é que cada tumor seja analisado individualmente e não como grupo, ou seja, o protocolo quimioterápico deve ser único para cada paciente, já que o mesmo tipo histológico pode não indicar a mesma graduação do sistema TNM, por exemplo, e consequentemente, influenciará na resposta desejada no paciente oncológico.

Testes terapêuticos *in vitro* podem apresentar limitada aplicação clínica no intuito de se extrapolar os resultados *in vitro* para *in vivo*, pois exclui as interações que ocorrem com os demais órgãos, tecidos e sistema imunológico do animal (SULTAN;HAAGSMAN, 2001; LI;LU, 2011). Porém são valiosas ferramentas para se obter uma resposta inicial de um fármaco frente a um tumor, e também para a busca de doses terapêuticas menores que diminuam os efeitos nocivos sobre as células normais e, conseqüentemente, reduzam os efeitos colaterais (ALLEY et al., 1988). O uso de tratamentos baseados em testes *in vitro* de sensibilidade parece ser mais responsivo do que aqueles empregados de forma empírica na clínica oncológica humana (CORTAZAR;JOHNSON, 1999). Ainda são importantes no objetivo em se determinar a susceptibilidade ou resistência de cada cultura de acordo com o quimioterápico empregado (SIMON et al., 2001).

VI CONCLUSÃO

Baseado nos resultados encontrados, sob as condições aqui adotadas, conclui-se que:

- A metodologia utilizada para a padronização dos cultivos celulares, provenientes de explantes de mastectomias de tumores mamários de cadelas, foi eficiente em se obter em algumas culturas até a vigésima passagem, com a utilização de um meio de cultivo básico comercial sem a necessidade de suplementações;
- As imunomarcações observadas comportaram-se de forma heterogênea no tumor original (imuno-histoquímica) e em seu respectivo cultivo (imunofluorescência) para a citoqueratina, vimentina, p53 e HER-2, com maior expressão na imunofluorescência para três dos marcadores, concluindo-se que trata-se de método limitado quando se deseja correlacionar a marcação em tecido e seu respectivo cultivo;
- As células cultivadas apresentaram alta sensibilidade à doxorrubicina nas suas diferentes concentrações, com 100% de morte celular a partir do tratamento de 0,5 μ M em alguns cultivos;
- Cada amostra apresentou comportamento único frente ao tratamento exposto, indicando a terapia individualizada nos pacientes oncológicos.

REFERÊNCIAS

ALLEY, M.C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human-tumor cell-lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v.48, n.3, p.589-601, 1988.

ARPINO, G.; LAUCIRICA, R.; ELLEDGE, R.M. Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. **Annals of Internal Medicine**, v.143, n.6, p.446-457, 2005.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Australian Veterinary Journal**, v.89, n.8, p.312-317, 2011.

BOTELHO, C.F. **Estudo histológico, imuno-histoquímico e de cultura de células de tecidos normais e cancerosos da mama humana e canina**. 2009. 68p. Dissertação (Mestre em Biologia Animal) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

BURDALL, S.E. et al. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, v.5, n.2, p.89-95, 2003.

CHANG, S.C. et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.10, p.1625-1629, 2005.

CORTAZAR, P.; JOHNSON, B.E. Review of the efficacy of individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing for patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.17, n.5, p.1625-1631, 1999.

CROSIER, M. et al. Differences in Ki-67 and C-erb B2 expression between screendetected and true interval breast cancers. **Clinical Cancer Research**, v.5, n.10, p.2682-2688, 1999.

DE LAS MULAS, J.M. et al. Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas - an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.80, n.3, p.633-367, 2003.

DE NARDI, A.B. **Correlação da ciclooxygenase-2 com Ki-67, P53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

DONE, S.J. et al. P53 protein accumulation in non-invasive lesions surrounding p53 mutation positive invasive breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.65, n.2, p.111-118, 2001.

DORE, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.40, n.2, p.207-212, 2003.

DORN, C.R.; SCHNEIDER, R. Inbreeding and canine mammary cancer retrospective study. **Journal of the National Cancer Institute**, v.57, n.3, p.545-548, 1976.

DUTRA, A.P. et al. C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.11, p.1673-1681, 2004.

EGENVALL, A. et al. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002.

Preventive Veterinary Medicine, v.69, n.1-2, p.109-127, 2005.

ERSTER, S. et al. In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. **Molecular Cell Biology**, v.24, n.15, p.6728-6741, 2004.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2010. 732p.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. v.2.

GILLES, C. et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. **Journal of Cell Science**, v.112, p.4615-4625, 1999.

GOULD, E.A. et al. Observations on a “sentinel node” in cancer of the parotid. **Cancer**, v.13, p.77-78, 1960.

GAMA, A. et al. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in canine mammary tissues. **Research in Veterinary Science**, v.87, n.3, p.432–437, 2009.

GROSSMANN, R. **Avaliação do papel dos marcadores imuno-histoquímicos pré-quimioterapia nas pacientes com carcinoma mamário localmente avançado na predição da sobrevida e recidiva**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade Federal Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 2007.

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

HELLMEN, E. et al. Prognostic factors in canine mammary-tumors - a multivariate study of 202 consecutive cases. **Veterinary Pathology**, v.30, n.1, p.20-27, 1993.

HERBST, R.S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.59, n.2, p.21-26, 2004.

HSU, W.L. et al. Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. **Veterinary Journal**, v.180, n.1, p.116-123, 2009.

KAWABATA, A. et al. Establishment and characterization of a cell line, MCO-Y4, derived from canine mammary gland osteosarcoma. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n.10, p.1047-1053, 2006.

KIM, E.; GIESE, A.; DEPPERT, W. Wild-type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v. 77, n. 1, p. 11-20, 2009.

KING, C. R. et al. EGF binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the ERBB-2 protein in the mammary-tumor cell-line SK-BR-3. **Embo Journal**, v.7, n.6, p.1647-1651, 1988.

KROL, M. et al. Transcriptomic profile of two canine mammary cancer cell lines with different proliferative and anti-apoptotic potential. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, p.95-106, 2009.

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.

KUDOH, K. et al. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced resistant cancer cells by c-DNA microarray. **Cancer Research**, v.60, n.15, p.4161-4166, 2000.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. P53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, v.13, n.2, p.293-325, 2006.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. Cap. 26, p. 619-636.

LAVALLE, G.E. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary Pathology**, v.46, n.6, p.1275-1280, 2009.

LEE, C.H. et al. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEE, S-T.; KWEON, O-K.; KIM, W.H. Establishment and characterization of canine mammary gland cancer cell lines. **Journal of Veterinary Clinics**, v.27, n.3, p.232-239, 2010.

LI, Y.-M. et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.363, n.1, p.209-215, 2007.

LIMA, A.E.S. **Caracterização da resposta inflamatória nos carcinomas mamários em cadelas**. 2011. 154f. Tese (Doutorado em Patologia) –

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas, Belo Horizonte, 2011.

MAHEO, K. et al. Differential sensitization of cancer cells to doxorubicin by DHA: A role for lipoperoxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.39, n.6, p.742-751, 2005.

MALAMOU-MITSI, V. et al. Evaluation of the prognostic and predictive value of p53 and Bcl-2 in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy. **Annals of Oncology**, v.17, n.20, p.1504-1511, 2006.

MARCONATO, L. et al. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 90-101, Jun 2008.

MARINHO, V.F.Z. et al. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.53, p.203-207, 2008.

MAURIAC, L. et al. Effect of primary chemotherapy in conservative treatment of breast cancer patients with operable tumors larger than 3 cm. Results of randomized trial in a single center. **Annals of Oncology**, v.2, n.5, p.47-54, 1991.

MERA, S.L.; YOUNG, E.W.; BRADFIELD, J.W.B. Direct immunofluorescence of skin using formalin-fixed paraffin-embedded sections. **Journal of Clinical Pathology**, v.33, n.4, p.365-369, 1980.

MICHELL, A. R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v.145, n.22, p.625-629, 1999.

MICHISHITA, M. et al. Characterization of spheres derived from canine mammary gland adenocarcinoma cell lines. **Research in Veterinary Science**, v.91, n.2, p.254-260, 2011.

_____. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.98, n.1, p.115-120, 2006.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell, 2002. Cap. 12, p.575-606.

MISDORP, W. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**, v. 7, n.1, p.1-59, 1999.

MORRISON, W. B. Canine and feline mammary tumors. In: _____. **Cancer in Dogs and Cats**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, p. 591-598.

MOUSER, P. et al. Prevalence and Classification of Spontaneous Mammary Intraepithelial Lesions in Dogs Without Clinical Mammary Disease. **Veterinary Pathology**, v.47, n.2, p.275-284, 2010.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v.366, n.1, p.2-16, 2006.

NUNES, C.B. **Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-HER₂ em arrays de carcinomas mamários: correlação com hibridação in situ cromogênica e avaliação interobservador**. 2007. 97f. Dissertação

(Mestrado em Patologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

O'KEEFE, D.A. Tumor do sistema genital. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1997. v.2, cap. 131, p. 2344-2351.

PAGNINI, U. et al. Modulation of anthracycline activity in canine mammary tumour cells in vitro by medroxyprogesterone acetate. **Research in Veterinary Science**, v.69, n.3, p.255-262, 2000.

PARIDAENS, R. et al. Paclitaxel versus doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer: A European organization for research and treatment of cancer randomized study with cross-over. **Journal of Clinical Oncology**, v.18, n.4, p.724-733, 2000.

PAWLOWSKI, K. M. et al. Comparison of cellular and tissue transcriptional profiles in canine mammary tumor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.60, suppl.1, p.85-94, 2009.

PIETSCH, E.C. et al. The p53 family and programmed cell death. **Oncogene**, v.27, n.50. p.6507–6521, 2008.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.543, p. 119-127, 2002.

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.94, n.1-3, p.181-187, 2005.

RANGEL, M.M.M. et al. Aspectos gerais sobre os principais antineoplásicos utilizados na clínica veterinária de cães e gatos: revisão de literatura. **Clínica Veterinária**, v. 81, p.38-52, 2009.

REIS-FILHO, J.S.; SCHMITT, F.C. Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. **Advance Anatomic Pathology**, v.9, n.5, p.280-289, 2002.

RESSEL, L. et al. HER-2 expression in canine morphologically normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissues and its correlation with the clinical outcome. **Research in Veterinary Science**, v.94, n.2, p.299-305, 2013.

RODASKI, S.; De NARDI, A.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: MedVet, 2008. 320p.

ROHAN, T. E. et al. Immunohistochemical detection of c-erbB-2 and p53 in benign breast disease and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v.90, n.17, p.1262-1269, 1998.

ROSS, J. S. et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. **Oncologist**, v.8, n.4, p.307-325, 2003.

RUNGSIPAT, A. et al. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.61, n.1, p.27-32, 1999.

RUTTEMAN, G.R. et al. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. cap.23, p. 455-477.

SARTIN, E.A. et al. Heterogenic properties of clonal cell lines derived from canine mammary carcinomas and sensitivity to tamoxifen and doxorubicin. **Anticancer Research**, v.13, p.229-236, 1993.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v.103, n.2, p.211-225, 2000.

SCHMITT, F. C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: Association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathology Research and Practice**, v.194, p.815-819, 1998.

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

SCHNEIDER, R.; DORN, C.R.; TAYLOR, D.O. Factors influencing mammary cancer development and postsurgical survival. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, n.6, p.1249-1261, 1969.

SIMON, D. et al. *In vitro* efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors obtained from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.11, p.1825-1830, 2001.

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

SIMON D. et al. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.1184-1190, 2006.

SLAMON, D.J. et al. Human-breast cancer - correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. **Science**, v.235, n.4785, p.177-182, 1987.

_____. Studies of the HER-2/NEU proto-oncogene in human-breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.41, n.2, p.219-219, 1989.

SOBRAL, R.A. **Expressão de PRSS11, MTSS1, CLPTM1, SMYD2, NOTCH1 e RPL37A em fatias de carcinoma de mama de cadelas e correlação com resposta à doxorubicina in vitro**. 2006. 99f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOBRAL, R. A. et al. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin *in vitro* treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, n.1, p.27, 2008.

SONNENSCHN, E.G. et al. Body conformation, diet and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. **American Journal of Epidemiology**, v.133, n.7, p.694-703, 1991.

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

SOUZA, W.A. et al. Toxicidade de antineoplásicos revisão bibliográfica. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v.6, n.11, 2008.

SOUZA, C.H.D.M. et al. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**, v.50, n.5, p.506-510, 2009.

STEFANO, D. et al. P63 expression in benign and malignant breast lesions. **Histology and Histopathology**, v.19, n.2, p.465-471, 2004.

STOLZING, A.; COLEMAN, N.; SCUTT, A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. **Rejuvenation Research**, v.9, n.1, p.31-35, 2006.

STOVRING, M.; MOE, L.; GLATTRE, E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. **Apmis**, v.105, n.8, p.590-596, 1997.

SULTAN, K.R.; HAAGSMANS, H.P. Species-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science. **Veterinary Sciences Tomorrow**, n.1, 2001.

TEIXEIRA, M.J. et al. Avaliação da superexpressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.521-526, 2011.

TODOROVA, I. Effects of chemotherapy alone and chemotherapy combined with antioxidants in dogs with mammary gland carcinoma. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v.14, n.1, p.45-56, 2011.

TODOROVA, I. et al. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in dogs with spontaneous mammary tumours. **Trakia Journal of Sciences**, v.3, n.5, p.51-58, 2005.

TORII, S. et al. Inhibitory effect of extracellular histidine on cobalt-induced HIF-1 alpha expression. **Journal of Biochemistry**, v.149, n.2, p.171-176, 2011.

TURTON, N.J. et al. Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. **Oncogene**, 20, n.11, p.1300–1306, 2001.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase-activity. **Cell**, v.61, n.2, p.203-212, 1990.

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

VERONESI, M. C. et al. Relationship between dysplastic and neoplastic mammary lesions and pseudopregnancy in the bitch. **Veterinary Research Communications**, v.27, suppl.1, p.245-247, 2003.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in health and disease. **Nature reviews, molecular cell biology**, v.8, n.4, p.275-83, 2007.

WU, X. et al. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. **Cytotechnology**, v.59, n.2, p.103-111, 2009.

WHITE, R.A.S. Tratamento cirúrgico de distúrbios cutâneos específicos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. v.1, cap.25, p. 339-355.

WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, n.1, p.118-145, 2007.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European Journal of Cancer**, v.37, suppl.4, p.S3-S8, 2001.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. **Cell Growth & Differentiation**, v.12, n.4, p.175–186, 2001.

ZATLOUKAL, J. et al. Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. **Acta Veterinaria Brno**, v.74, n.1, p.103-109, 2005.

ZUCCARI, D.A.P.C. et al. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias – importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. **Arquivo Ciências Saúde**, v.15, n.4, p.189-198, 2008.

APÊNDICE A

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



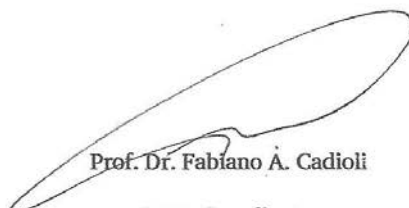
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

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

APÊNDICE B

Tabela 1A - Ficha clínica oncológica para os tumores mamários e sistema TNM modificado (Owen, 1980).

TUMORES DE MAMA EM CADELAS

Nome:	RG:	Data:
Raça:	Sexo:	Idade:
Proprietário:	Telefone: ()	

I) FORMULÁRIO GERAL DE AVALIAÇÃO

1. Ciclo Estral : () Regular () Irregular () Não Apresenta () N.S.I.*
2. N° de Gestações: () Ausente () Uma () Outros Valores:_____ () N.S.I.*
3. Pseudogestação: () Sim (Frequência:_____) () Não
4. Abortos: () Sim () Não
5. Castração: () Sim (Data: / /) () Não
() Eletiva () Pseudociese () Tumor de mama () Cesariana () Piometra () N.S.I.
6. Alterações Uterinas (secreção)/Quando?: () Sim (Data: / /) () Não
7. Cruzamentos sem prenhez?: () Sim () Não
8. Uso de Hormônios: () Anticoncepcionais () Abortivos () Não
(Tipo:_____) (Data: / /) (N° Vezes/Freqüência:_____)
9. Efeitos Colaterais (pós-hormônio): () Sim (Data: / /) () Não
10. Tumores prévios: () Sim (Tipo: () Mama () Outros) () Não
(Localização:_____) (Evolução:_____)
(Cirurgia: () Sim (Data: / /) () Não) (Recidivas: () Sim () Não)
11. Tipo de Dieta: () Caseira () Ração () Outros
Discriminar:_____
12. Tipo de Água: () Mineral () Torneira () Poço Artesiano () Outros:_____
13. Outras Observações:_____

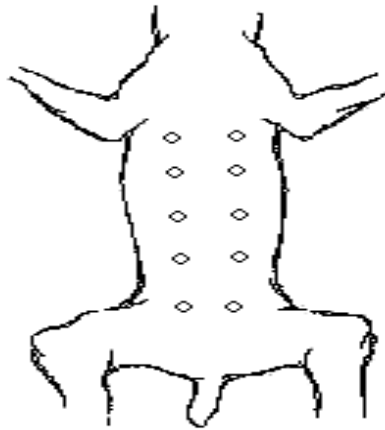
II) FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

1. Histórico do animal/Evolução: _____

2. Diâmetro Máximo do(s) Tumor(es):

() Menor que 3 cm () 3-5 cm () Maior que 5 cm () Outros: _____

Descrição/Localização: _____



3. Invasão de gânglios Linfáticos à Palpação:

() Não Evidente () Evidente. Onde?: _____

Confirmada com resultado histo ou citopatológico: () Sim () Não

4. Metástases à Distância:

() Ausente () Presente. Onde?: _____

5. Crescimento Tumoral:

() Lento – Tempo aproximado: _____ () Rápido – Tempo aproximado: _____

6. Ulceração:

() Ausente () Presente. Onde?: _____ Tempo aproximado: _____

7. Presença de contaminação: () Sim () Não

8. Quanto à Infiltração do Nódulo(s):

() Pedunculado () Aderido

Onde: _____

III) SISTEMA TNM (TUMOR/NODE/METASTASIS) - ESTADIAMENTO DOS TUMORES DE MAMA EM CADELAS

T: diâmetro máximo do tumor

T₁: < 3cm de diâmetro

T₂: 3 - 5 cm de diâmetro

T₃: > 5cm de diâmetro

N: envolvimento de linfonodos regionais

N₀: ausência de metástases (cito ou histopatológico)

N₁: presença de metástases (cito ou histopatológico)

M: presença de metástases à distância

M₀: ausência de metástases

M₁: presença de metástases à distância

ESTÁGIO	T	N	M
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	qualquer	N ₁	M ₀
V	qualquer	qualquer	M ₁

ESTÁGIO: